

**PCT**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<b>(51) International Patent Classification <sup>6</sup>:</b> <b>G01N 21/03, 21/64</b>	<b>A1</b>	<b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 97/21089</b> <b>(43) International Publication Date:</b> 12 June 1997 (12.06.97)
<b>(21) International Application Number:</b> PCT/US96/19238 <b>(22) International Filing Date:</b> 3 December 1996 (03.12.96)  <b>(30) Priority Data:</b> 08/568,606 5 December 1995 (05.12.95) US  <b>(71) Applicant:</b> THE PERKIN-ELMER CORPORATION [US/US]; 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404 (US).  <b>(72) Inventors:</b> RAGUSA, Robert. P.; 14405 DeBell Road, Los Altos, CA 94022 (US). WOUTENBERG, Timothy, M.; 120 Harbor Lane, Moss Beach, CA 94038 (US). MARMARO, Jeffrey, M.; 15154 E. Wesley Avenue, Aurora, CO 80014 (US).  <b>(74) Agents:</b> STRATFORD, Carol, A. et al.; Dehlinger & Asso- ciates, P.O. Box 60850, Palo Alto, CA 94306-0850 (US).		<b>(81) Designated States:</b> AU, CA, JP, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Published</b> <i>With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>
<b>(54) Title:</b> OPTICAL CUVETTE  <b>(57) Abstract</b> <p>An improved fluorescence monitoring apparatus for measuring fluorescent emission from a sample in response to sample irradiation by an emission beam is disclosed. The apparatus employs a sample tube having surface roughness characteristics which substantially reduce background fluorescence emission due to contamination of the tube holder in the apparatus. Also disclosed is a method of reducing such background, by texturing of a sample tube to produce desired roughness characteristics.</p> <div data-bbox="1088 1134 1477 1890"></div>		

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	Mexico
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Greece	NL	Netherlands
BE	Belgium	HU	Hungary	NO	Norway
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	IT	Italy	PL	Poland
BJ	Benin	JP	Japan	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Romania
BY	Belarus	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapore
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lithuania	SZ	Swaziland
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LV	Latvia	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finland	MN	Mongolia	US	United States of America
FR	France	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

## OPTICAL CUVETTE

**Field of the Invention**

The present invention relates to the field of reaction vessels adapted for use in fluorescent detection systems, and in particular, to a reaction vessel for use in a apparatus that employs fluorescence-based measurements of nucleic acid amplification products. The invention also includes a method for reducing fluorescent background in a fluorescence monitoring apparatus.

**References**

- 10 Fung et al., U.S. patent 4,855,225  
Menchen et al., U.S. patent 5,188,934  
Bergot et al., International Patent Application PCT/US90/05565  
Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 7276-7280 (1991)  
Karger et al., Nucleic Acids Research, 19: 4955-4962 (1991)  
15 Keller and Manak, DNA Probes, Second Edition (Stockton Press, New York, 1993).  
Lee et al., Nucleic Acid Research, 21: 3761-3766 (1993)  
Walker et al., Nucleic Acids Research, 20:1691-1696 (1992).  
Haugland, pgs. 221-229 in Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals,  
5th Edition (Molecular Probes, Inc., Eugene, 1992)  
20 Glazer et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 3851-3855 (1990)  
Srinivasan et al., Applied and Theoretical Electrophoresis, 3: 235-239 (1993)  
Kapuscinski et al., Anal. Biochem., 83: 252-257 (1977)  
Hill, Anal. Biochem., 70: 635-638 (1976)  
Setaro et al., Anal. Biochem., 71: 313-317 (1976)  
25 Latt et al., J. Histochem. Cytochem., 24:24-33 (1976)  
Rye et al., Nucleic Acids Research, 20: 2803-2812 (1992)

**Background of the Invention**

Fluorescent detection of reaction products is common in a number of analytical settings. Typically, analytical instruments for monitoring fluorescent reactions are equipped with reaction chambers designed to minimize fluorescence from external sources, for example, by providing a light-impermeable compartment constructed of non-fluorogenic materials. However, such precautions may not prevent fluorescent emissions from contamination sources, such as flecks of hair or skin introduced to the chamber during sample manipulation.

The present invention provides a sample tube which is constructed to reduce fluorescence from external sources. The tube is particularly useful in nucleic acid amplification reactions, such as the polymerase chain reaction (PCR) in which progress of the reaction is monitored.

5 PCR has become a research tool of major importance with applications in cloning, analysis of genetic expression, DNA sequencing, genetic mapping, drug discovery, and the like, e.g. Arnheim et al (cited above); Gilliland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 2725-2729 (1990); Bevan et al., *PCR Methods and Applications*, 1: 222-228 (1992); Green et al., *PCR Methods and Applications*, 1: 77-90 (1991); Blackwell et al., *Science*, 250: 1104-1110 (1990).

10 While a number of instruments have been developed for carrying out nucleic acid amplification, most employ basic PCR technology, e.g. Johnson et al., U.S. patent 5,038,852 (computer-controlled thermal cycler); Wittwer et al., *Nucleic Acids Research*, 17: 4353-4357 (1989)(capillary tube PCR); Hallsby, U.S. patent 5,187,084 (air-based temperature control); Garner et al., *Biotechniques*, 14: 112-115 (1993)(high-throughput PCR in 864-well plates); Wilding et al., International application No. PCT/US93/04039 (PCR in micro-machined  
15 structures); Schnipelsky et al., European patent application No. 90301061.9 (publ. No. 0381501 A2)(disposable, single use PCR device), and the like. Important design goals fundamental to PCR instrument development have included fine temperature control, minimization of sample-to-sample variability in multi-sample thermal cycling, automation of pre- and post-PCR processing steps, high speed cycling, minimization of sample volumes, real  
20 time measurement of amplification products, minimization of cross-contamination, or sample carryover, and the like.

Recently, PCR designs have focused on instruments that permit the amplification reaction to be carried out in closed reaction chambers and monitored in real time. Closed reaction chambers are desirable for preventing cross-contamination, e.g. Higuchi et al., *Biotechnology*,  
25 10: 413-417 (1992) and 11: 1026-1030 (1993) and Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 7276-7280 (1991). Real time monitoring is particularly desirable in the analysis of diagnostic samples, where high frequencies of false positives and false negatives can severely reduce the value of the PCR-based procedure.

Moreover, real time monitoring of PCR permits far more accurate quantitation of starting  
30 target DNA concentrations in multiple-target amplifications, as the relative values of close concentrations can be resolved by taking into account the history of the relative concentration values during the PCR. Real time monitoring also permits the efficiency of the PCR to be evaluated, which can indicate whether PCR inhibitors are present in a sample.

Holland et al (cited above) and others have proposed fluorescence-based approaches to provide real time measurements of amplification products during PCR. Such approaches have either employed intercalating dyes (such as ethidium bromide) to indicate the amount of double stranded DNA present, or they have employed probes containing fluorescer-quencher pairs (the so-called "Tac-Man" approach) that are cleaved during amplification to release a fluorescent product whose concentration is proportional to the amount of double stranded DNA present.

Unfortunately, successful implementation of these approaches has been impeded because the required fluorescent measurements must be made against a very high fluorescent background. Thus, even minor sources of instrumental noise, such as the formation of condensation in the chamber during heating and cooling cycles, formation of bubbles in an optical path, particles or debris in solution, differences in sample volumes--and hence, differences in signal emission and absorbance, and the like, have hampered the reliable measurement of the fluorescent signals.

Co-owned patent application Publication No. WO 9530139 describes an apparatus that provides stable and reliable real time measurement of fluorescent indicators of amplification products resulting from any of the available nucleic acid amplification schemes. This apparatus operates by directing into a fluorescent mixture an excitation beam having appropriate energy to excite the fluorescent centers present in the mixture. The present invention is directed to an improvement of this apparatus which includes using a reaction tube that reduces background fluorescence measured from a test sample by reducing the amount of exogenous fluorescence that enters the tube from outside sources such as contamination present in the apparatus tube-holder. As particularly described herein, the tube is a plastic consumable tube having an irregular or roughened outer surface that deflects or diffuses incident fluorescence emissions emanating from outside the tube. However, it is also preferable that the tube remain sufficiently clear to permit the human user to visualize fluid volume contained in the tube. Moreover, the tube may be sealable and provide a limited transparent window region to allow transmittance of an excitation beam to a sample held in the tube.

While the described tube is particularly suited for use in a PCR monitoring apparatus, such as that described in co-owned patent application Publication No. WO 9530139, it can be appreciated that such tubes are also suited for use in other instruments in which detection of light emissions is measured, and particularly those in which such measurement is carried out in a "plate-reader" format.

#### Summary of the Invention

The invention includes, in one aspect, a fluorescence monitoring apparatus for measuring fluorescent emission from a sample in response to sample irradiation by an emission beam. The apparatus has an excitation beam source capable of directing an excitation beam into the sample, a tube-holder having a wall portion capable of supporting a tube, a tube for holding the sample, and a detector capable of detecting fluorescent emissions from the sample in the tube. The tube, which is typically formed of polycarbonate or polypropylene, is textured in the region of the tube supported by said tube-holder wall portion. The textured region is characterized by a surface roughness and peak density effective to significantly reduce background fluorescence detected by the detector in response to fluorescence emission related to contamination on the tube holder wall portion.

In a preferred embodiment, the tube has a textured outer surface characterized by a peak density of between about 50 and 500 peaks/0.5 inch line, more preferably 200 and 500 peaks/0.5 inch line. Also in a preferred embodiment, the surface roughness is characterized by an average depth of 0.0002 and 0.003 inch, more preferably less than 0.001 inch.

In a related aspect the invention includes a method for reducing fluorescence background in a fluorescence monitoring apparatus designed for detecting fluorescent emission from a sample contained in a tube, where the tube is supported by wall portions of a tube-holder in the apparatus. The method includes texturing the surface region of the tube supported by the wall portion to produce a surface roughness effective to significantly reduce background fluorescence detected by the apparatus in response to fluorescence emission related to contamination on the tube holder wall portion.

In one general embodiment, the surface texturing is produced by casting the tube in a mold having an etched mold surface. In another embodiment, the outer surface region of the tube is abraded, e.g., by treatment with abrasive paper, to form the desired roughness characteristics, as above.

These and other objects and features of the invention will become more fully apparent when the following detailed description of the invention is read in conjunction with the accompanying drawings.

### Brief Description of the Figures

FIG. 1 diagrammatically illustrates the sample interface components of the apparatus of the invention, including the improved reaction vessel;

FIG. 2 diagrammatically illustrates an apparatus of the invention configured for simultaneous monitoring of a plurality of amplification reactions by sequentially interrogating reactions via a fiber optic multiplexer;

FIG. 3A shows a side view of an optical tube in accordance with the invention;

5 FIG. 3B shows a cross-sectional view of the tube illustrated in FIG. 3A;

FIG. 4 shows an emission spectra measured from a moderately contaminated well in a ATC apparatus fitted with various tubes;

FIG. 5 shows an emission spectra measured from a highly contaminated well in a ATC apparatus fitted with various tubes;

10 FIG. 6 shows spectrally separated fluorescent intensity data for a tetramethylrhodamine fluorescent indicator, a fluorescein fluorescent indicator, and instrument background registered by a CCD array of the preferred embodiment described below;

FIG. 7 shows the time dependence of fluorescent signals from a fluorescein dye proportional to the amplification product (first fluorescent indicator) and a  
15 tetramethylrhodamine dye employed as a second fluorescent indicator during a typical PCR;

FIG. 8 shows the cycle dependence of the ratio of the intensities of the fluorescein and tetramethylrhodamine dyes from the same PCR whose time dependent data is shown in Figure 6; and

FIG. 9 shows data relating the amount of amplification product to cycle number in  
20 separate PCRs having different starting concentrations of the same target nucleic acid.

## Detailed Description of the Invention

### I. Definitions

As used herein, the term "stable" in reference to a fluorescent signal means that the root  
25 means square (RMS) deviation in the signal due to noise is less than or equal to two percent of the average signal magnitude. More preferably, stable means that the RMS deviation in the signal due to noise is less than or equal to one percent of the average signal magnitude.

"Roughness" is a measure of peak-to-valley distances on a surface, and is commonly expressed as arithmetic average value of absolute distances above and below a reference plane  
30 along a line. A related measure of roughness is the average depth of the valleys forming the texture below a surface plane.

Another surface-texture property is "summit density" or "peak density", which provides a measure of peak density in a given surface area. Both roughness and peak density can be measured using a profilometer.

## II. Real Time Detection Apparatus

### A. Apparatus

5 The invention includes a fluorescence-based apparatus for monitoring in real time the progress of a nucleic acid amplification reaction, as described in co-owned patent application Publication No. WO 9530139, incorporated herein by reference. The type of amplification scheme used with the apparatus is not critical, but generally the apparatus requires either the use of a nucleic acid polymerase with exonuclease activity or a population of double stranded DNA which increases during the course of the reaction being monitored. Exemplary  
10 amplification schemes that may be employed with the apparatus of the invention include PCR, ligase-based amplification schemes, such as ligase chain reaction (LCR), Q-beta replicase-based amplification schemes, strand displacement amplification (SDA) schemes, such as described by Walker et al., and the like. A comprehensive description of nucleic acid amplification schemes is provided by Keller and Manak, - DNA Probes, Second Edition (Stockton Press, New York,  
15 1993). Fundamental to the apparatus is the measurement of ratios of fluorescent intensities of a first fluorescent indicator and an internal standard, referred to herein as a second fluorescent indicator. The first and second fluorescent indicators must be spectrally resolvable. That is, their respective emission spectra must be sufficiently non-overlapping so that separate emission peaks are observed in the combined spectrum. Clearly, the apparatus may be generalized to  
20 include a plurality of first fluorescent indicators, e.g. to monitor the simultaneous amplification of several target nucleic acids in a single reaction, so that a plurality of fluorescent intensity ratios are monitored. Several spectrally resolvable dyes suitable for use in such embodiments are disclosed in Fung et al., U.S. patent 4,855,225; Menchen et al., U.S. patent 5,188,934; Bergot et al., International Application PCT/US90/05565; and like references.

25 The apparatus includes an excitation beam source capable of directing an excitation beam into a sample. Preferably this beam source is part of a sample interface—that is, optical components operationally associated with a closed reaction chamber which comprises a lens for focusing an excitation beam into the reaction mixture and for collecting the resulting fluorescence and a fiber optic for transmitting both the excitation beam from a light source to  
30 the lens and the fluorescent signals from the lens to a detection and analysis means. Preferably, the reaction mixture is contained in a closed reaction chamber, such as a closed tube, to prevent cross-sample contamination, or so-called "carryover." The lens focuses the excitation beam and collects fluorescence through a portion of a wall of the closed reaction chamber.



As mentioned above, the preferred reaction chamber is a tube, e.g. having the geometry of a conventional 200  $\mu$ l "Eppendorf™" tube. The tube may closed after the reaction mixture is added by attaching a cap to the open end of the tube. In a preferred embodiment of the sample interface for PCR, the lens directs the excitation beam and collects fluorescence through a clear opening in the tube, illustrated as a clear cap in FIG. 1. According to an important aspect of the present invention, the reaction tube is manufactured to have optical characteristics which reduce background readings. This aspect of the invention is described in detail in Part B, below.

In the embodiment illustrated in FIG. 1, a first end fiber optic 2 is held by ferrule 4, housing 6, and plate 10 in a co-axial orientation with lens 8. A second end of fiber optic 2 (not shown) is operationally associated with a light source and detection and analysis means, discussed more fully below. The distance between the end face of fiber optic 2 and lens 8 is determined by several factors, including the numerical aperture of the fiber optic, the geometry of tube 18, the focal length of lens 8, the diameter of lens 8, and the like. Guidance for selecting values for such variables in any particular embodiment is readily found in standard texts on optical design, e.g. Optics Guide 5 (Melles Griot, Irvine, CA, 1990), or a like reference. In the illustrated embodiment, lens 8 has a diameter of 8 mm and is composed of material BK7, available from Edmund Scientific (Barrington NJ). Fiber optic 2 has a numerical aperture of 0.2. Preferably, the design permits maximal transmission of excitation beam 28 to reaction mixture 22. For example, lens 8, numerical aperture of fiber optic 2, and the distance between the end of fiber optic 2 and lens 8 are selected so that the diameter of lens 8 equals or exceeds the diameter of excitation beam 28 where beam 28 impinges on the lens (as illustrated in FIG. 1). Excitation beam 28 is focused through cap 16 of tube 18, void 24, and top surface 26 of reaction mixture 22 to a region approximately 1-3 times the diameter of the fiber optic just below, e.g. 1-3 mm, surface 26. Tube 22 is positioned in tube-holder 23. This degree of focusing is not a critical feature of the embodiment; it is a consequence of adapting the sample interface to the geometry and dimensions of a sample holder of a commercially available thermal cycler. In other embodiments, the geometry and dimension may permit a sharper focus into the reaction mixture.

The lens of the apparatus may have a variety of shapes depending on particular embodiment and desired geometry of the sample to be tested. For example, the lens may be a sphere, truncated sphere, cylinder, truncated cylinder, oblate spheroid, or truncated oblate spheroid, or the like, and may be composed of any suitably transparent refractive material,

such as disclosed by Hlousek U.S. patent 5,037,199; Hoppe et al., U.S. patent 4,747,87; Moring et al., U.S. patent 5,239,360; Hirschfield, U.S. patent 4,577,109; or like references.

5 With continued reference to FIG. 1, emitted fluorescent light given off by reaction mixture 22 in response to excitation beam 28 is collected by lens 8 along approximately the same optical pathway as that defined by excitation beam 28. The emitted light is focused onto the end of fiber optic 2 for transmission to optical separation and analysis components of the apparatus, discussed below. The beam source and focusing components just described are also referred to herein as an excitation beam source capable of directing an excitation beam into a sample.

10 In a preferred embodiment, the sample interface also includes means for heating the portion of the wall of the reaction chamber used for optical transmission, in order to reduce variability due to scatter and/or absorption of the excitation beam and signal from condensation of reaction mixture components. In the embodiment shown in FIG. 1, the portion of the reaction chamber (tube 18) wall used for optical transmission is tube cap 16. Accordingly, 15 heating element 12 and heat-conductive platen 14 are employed to heat cap 16. Preferably, heating element 12 comprises resistance heating elements and temperature sensors that permit programmed controlled of the temperature of cap 16. Cap 16 is maintained at a temperature above the condensation points of the components of the reaction mixture. Generally, cap 16 may be maintained at a temperature in the range of 94-110°C. Preferably, cap 16 is 20 maintained at a temperature in the range of about 102°C to about 105°C, since the principal solvent in the reaction mixture is usually water. More preferably, cap 16 is maintained at 103°C. Preferably, in embodiments employing thermal cycling, the cap heating components described above are thermally isolated from heating-conducting block 20 employed to cyclically control the temperature of reaction mixture 22. Block 20 defines one or more tube holders, 25 each having a wall portion, such as holder 21 having wall portion 23, capable of supporting a tube, such as tube 18. As will be described below, the wall portion of the tube holder may have surface contaminants which can cause spurious fluorescence emission in the apparatus.

30 Selection of appropriate materials for the components described above is well within the skill of an ordinary mechanical engineer. Exemplary criteria for material selection include (i) degree of thermal expansion, especially for amplification schemes employing thermal cycling, and its effect on the alignment of the optical components, (ii) optical transmission properties in the excitation wavelengths and fluorophore emission wavelengths employed, (iii) chemical inertness of the reaction chamber relative to components of the reaction mixture, (iv) degree to which critical reaction components, e.g. polymerases, target nucleic acids, would tend to

adsorb onto chamber walls, (v) minimization of fluorescent materials in the optical pathway, and the like. Typically, tubes containing amplification reaction mixtures are made of polypropylene, polycarbonate or like materials.

5 The sample interface shown in FIG. 1 may be employed individually or it may be employed as one of a plurality of identical interfaces in a single instrument, as shown diagrammatically in FIG. 2. In the illustrated embodiment, individual sample interfaces 31, arrayed in tube-holder 29 in block 30 (which may, for example, be a heating block associated with thermal cycler 32, such as described in Mossa et al., European patent application No. 91311090.4, publ. No. 0488769 A2) are connected by fiber optics 34 to fiber optic multiplexer 10 36, which selectively permits transmission between individual fiber optics and port 35, e.g. under user control via a programmed microprocessor.

In a preferred configuration, excitation beam 41, generated by light source 52 and controller 54, passes through beam splitter 40 and is focused onto port 35 by lens 38, where it is sequentially directed by fiber optic multiplexer 36 to each of a predetermined set, or 15 subset, of fiber optics 34. Conversely, with reference to the sample interface shown in FIG. 1, fluorescent signals generated in the reaction chambers are collected by lens 8 and focused onto a fiber optic which, in turn, transmits the signal to a detection and analysis means, possibly via a fiber optic multiplexer. Returning to FIG. 2, a fluorescent signal collected by a sample interface is directed to fiber optic multiplexer 36 where it emerges through port 35 20 and is collected and collimated by lens 38. Lens 38 directs the fluorescent signal to beam splitter 40 which, in turn, selectively directs the signal through cut-off filter 42, which prevents light from the excitation beam from reaching the signal detection components. Beam splitter 40 may be a conventional dichroic mirror, a fully reflective mirror with an aperture to pass the excitation beam (e.g. as disclosed in U.S. patent 4,577,109), or like component. After passing 25 through cut-off filter 42, the fluorescent signal is directed by lens 44 to a spectral analyzer which spectrally separates the fluorescent signal and measures the intensities of a plurality of the spectral components of the signal. Typically, a spectral analyzer comprises means for separating the fluorescent signal into its spectral components, such as a prism, diffraction grating, or the like, and an array of photodetectors, such as a diode array, a charge-coupled device (CCD) apparatus, an array of bandpass filters and photomultiplier tubes, or the like. 30 In the preferred embodiment shown in FIG. 2, the spectral analyzer comprises diffraction grating 46 (e.g., model CP-140, Jobin-Yvon, NJ) and CCD array 48 (e.g., model S2135 Princeton Instruments, NJ), which is linked to CCD controller 50.

An exemplary CCD array suitable for analyzing fluorescent signal from fluorescein and tetramethylrhodamine is partitioned into 21 collection bins which span the 500 nm to 650 nm region of the spectrum. Each bin collects light over an 8.5 non window. Persons skilled in the art will recognize that many alternative configurations may also be employed to achieve substantially the same end result. An exemplary application of a CCD array for spectral analysis is described by Karger et al., *Nucleic Acids Research*, 19: 4955-21962 (1991). The components described above for detecting fluorescence emission from the samples in the tubes are also referred to herein, collectively, as detection means.

Analyzing the fluorescent signal based on data collected by a spectral analyzer is desirable since components of the signal due to one or more first fluorescent indicators and a second fluorescent indicator can be analyzed simultaneous to calculating intensity ratios without introducing wavelength-specific apparatus variability that might arise, e.g. by misalignment, in a apparatus based on multiple beam splitters, filters, and photomultiplier tubes. Also, a spectral analyzer permits the use of "virtual filters" or the programmed manipulation of data generated from the array of photo-detectors, wherein a plurality of discrete wavelength ranges are sampled --in analogy with physical bandpass filters-- under programmable control via an associated microprocessor. This capability permits a high degree of flexibility in the selection of dyes as first and second fluorescent indicators.

Generally, the detection and analysis means may be any detection apparatus that provides a readout that reflects the ratio of intensities of the signals generated by the first and second fluorescent indicators. Such apparatuses are well known in the art, as exemplified by U.S. patents 4,577,109 and 4,786,886 and references such as *The Photonics Design & Applications Handbook*, 39th Edition (Laurin Publishing Co., Pittsfield, MA, 1993).

Preferably, the apparatus of the invention is employed to monitor PCRs, although it may also be employed with a variety of other amplification schemes, such as LCR. Descriptions of and guidance for conducting PCRs is provided in an extensive literature on the subject, e.g. including Innis et al (cited above) and McPherson et al (cited above). Briefly, in a PCR, two oligonucleotides are used as primers for a series of synthetic reactions that are catalyzed by a DNA polymerase. These oligonucleotides typically have different sequences and are complementary to sequences that (i) lie on opposite strands of the template, or target, DNA and (ii) flank the segment of DNA that is to be amplified. The target DNA is first denatured by heating in the presence of a large molar excess of each of the two oligonucleotides and the four deoxynucleoside triphosphates (dNTPs). The reaction mixture is then cooled to a temperature that allows the oligonucleotide primers to anneal to their target sequences, after which the

annealed primers are extended with DNA polymerase. The cycle of denaturation, annealing, and extension is then repeated many times, typically 25-35 times. Because the products of one round of amplification serve as target nucleic acids for the next, each successive cycle essentially doubles the amount of target DNA, or amplification product.

5 As mentioned above an important aspect of the invention is the fluorescent dyes used as the first and second fluorescent indicators. By examining the ratio of the fluorescent intensities of the indicators, the effects of most sources of systematic variability, which would be apparent in the intensities alone, are eliminated. Generally, in accordance with the invention, the first fluorescent indicator may be a complex forming dye or a dye covalently attached to an  
10 oligonucleotide probe which is degraded during polymerization steps to generate a signal. This later embodiment relates to the so-called "Tacman" approach, described by Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 7276-7280 (1991). As used herein, the term "complex-forming" in reference to a dye means that the dye is capable of forming a stable non-covalent complex with either double stranded or triple stranded nucleic acid structures, usually DNA, and that  
15 the dye's fluorescent characteristics are substantially different in the complexed state as compared to a non-complexed, i.e. usually free-solution, state. Preferably, the quantum efficiency of fluorescence of a complex-forming dye is enhanced in the complexed state as compared to the free-solution state, thereby resulting in enhanced fluorescent upon complex formation. Exemplary complex-forming dyes include ethidium bromide, propidium iodide,  
20 thiazole orange, acridine orange, daunomycin, mepacrine, 4',6'diaminidino-2-phenylindole (DAPI), oxazole orange, bisbenzimidazole dyes, such as Hoechst 33258 and Hoechst 33342, and heterodimers of various intercalating dyes, such as ethidium, acridine, thiazolium, and oxazolium dyes (known by their acronyms POPRO, BOPRO, YOPRO, and TOPRO), and like dyes, which are described in the following references: Haugland, pgs. 221-229 in Handbook  
25 of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 5th Edition (Molecular Probes, Inc., Eugene, 1992); Glazer et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 3851-3855 (1990); Srinivasan et al., Applied and Theoretical Electrophoresis, 3: 235-239 (1993); Kapuscinski et al., Anal. Biochem., 83: 252-257 (1977); Hill, Anal. Biochem., 70: 635-638 (1976); Setaro et al., Anal. Biochem., 71: 313-317 (1976); Latt et al., J. Histochem. Cytochem., 24:24-33 (1976); and Rye et al., Nucleic  
30 Acids Research, 20: 2803-2812 (1992). Preferably, when complex-forming dyes are employed as first fluorescent indicators, such dyes are selected from the group consisting of thiazole orange, ethidium bromide, and TOPRO.

Dyes employed as second fluorescent indicators include fluorescent dyes whose fluorescent characteristics are substantially unaffected by the presence or association with

nucleic acids, particularly double stranded DNA. Such dyes may include virtually any fluorescent dye fulfilling this criterion which is also spectrally resolvable from the first fluorescent indicator employed in the particular reaction. Preferred second fluorescent indicators include rhodamine dyes and fluorescein dyes. More preferably, the second fluorescent indicator is tetramethylrhodamine or 2',4',5',7',tetrachloro-4,7-dichlorofluorescein, the latter being disclosed by Menchen et al., U.S. patent 5,188,934.

In a preferred embodiment, a first fluorescent indicator and a second fluorescent indicator are both covalently attached to an oligonucleotide probe as described by Lee et al., *Nucleic Acid Research*, 21: 3761-3766 (1993). More specifically, fluorescein is used as the first fluorescent indicator and tetramethylrhodamine is used as the second fluorescent indicator such that the tetramethylrhodamine moiety substantially quenches any fluorescent emissions by the fluorescein moiety. Thus, when both dyes are attached to the same oligonucleotide, only the tetramethylrhodamine is capable of generating a fluorescent signal. When the oligonucleotide is cleaved, e.g. via the 5' -> 3' exonuclease activity of a DNA polymerase, separating the two dyes, the fluorescein becomes capable of generating a fluorescent signal. Preferably, in this embodiment, the excitation beam is generated from the 488 nm emission line of an argon ion laser. In accordance with the invention, in a PCR the production of "free" fluorescein in this embodiment is proportional to the amount of DNA synthesis catalyzed by the DNA polymerase employed, and hence, the amount of amplification product. In this embodiment, preferably the first fluorescent indicator is fluorescein, e.g. 6-FAM (available from Applied Biosystems, Foster City); and the second fluorescent indicator is either tetramethylrhodamine or 2',4',5',7',tetrachloro-4,7-dichlorofluorescein.

Such oligonucleotide probes of the invention can be synthesized by a number of approaches, e.g. Ozaki et al., *Nucleic Acids Research*, 20: 5205-5214 (1992); Agrawal et al., *Nucleic Acids Research*, 18: 5419-5423 (1990); or the like. Preferably, the oligonucleotide probes are synthesized on an automated solid phase DNA synthesizer using phosphoramidite chemistry, e.g. Applied Biosystems, Inc. model 392 or 394 DNA synthesizer (Foster City, CA). The first and second fluorescent indicators can be covalently attached to predetermined nucleotide of an oligonucleotide by using nucleoside phosphoramidite monomers containing reactive groups. For example, such reactive groups can be on a phosphate, or phosphate analog, e.g. Agrawal et al (cited above), on the 5' hydroxyl when attachment is to the 5' terminal nucleotide, e.g. Fung et al., U.S. patent 4,757,141 or Hobbs Jr., U.S. patent 4,997,928, and on base moieties, e.g. as disclosed by Ruth, U.S. patent 4,948,882; Haralarnbidis et al., *Nucleic Acids Research*, 15: 48<7-4876 (1987); Urdea et al., U.S. patent

5,093,232; Cruickshank U.S. patent 5,091,519; Hobbs Jr. et al., U.S. patent 5,151,507; or the like. Most preferably, nucleotides having pyrimidine moieties are derivatized. In further preference, the 3' terminal nucleotide of the oligonucleotide probe is blocked or rendered incapable of extension by a nucleic acid polymerase. Such blocking is conveniently carried out by the attachment of a phosphate group, e.g. via reagents described by Horn and Urdea, Tetrahedron Lett., 27: 4705 (1986), and commercially available as 5' Phosphate-ONIM from Clontech Laboratories (Palo Alto, California). Preferably, the oligonucleotide probe is in the range of 15-60 nucleotides in length. More preferably, the oligonucleotide probe is in the range of 18-30 nucleotides in length.

The separation of the first and second fluorescent indicators within the oligonucleotide probe can vary depending on the nature of the first fluorescent indicator and second fluorescent indicator, the manner in which they are attached, the illumination source, and the like. Guidance concerning the selection of an appropriate distance for a given embodiment is found in numerous references on resonant energy transfer between fluorescent molecules and quenching molecules (also sometimes referred to as "donor" molecules and "acceptor" molecules, respectively), e.g. Stryer and Haugland, Proc. Natl. Acad. Sci., 58: 719-726 (1967); Clegg, Meth. Enzymol., 211: 353-388 (1992); Cardullo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 8790-8794 (1988); Ozaki et al (cited above); Haugland (cited above); Heller et al., Fed. Proc., 46: 1968 (1987); and the like. The first and second fluorescent indicators must be close enough so that substantially all, e.g. 90%, of the fluorescence from the first fluorescent indicator is quenched. Typically, for energy transfer-based quenching, the distance between the first and second fluorescent indicators should be within the range of 10-100 angstroms. Preferably, the first and second fluorescent indicators are separated by between about 4 to 10 nucleotides, and more preferably, they are separated by between 4 and 6 nucleotides, with the proviso that there are no intervening secondary structures, such as hairpins, or the like. Preferably, either the first or second fluorescent indicator is attached to the 5' terminal nucleotide of the oligonucleotide probe.

Clearly, related embodiments of the above may be employed wherein the first fluorescent indicator is attached to an oligonucleotide probe with another non-fluorescent quenching molecule, instead of a second fluorescent indicator. In such embodiments, the second fluorescent indicator could be virtually any spectrally resolvable fluorescent dye that did not interact with the amplification products.

#### B. Reaction Chamber

An important feature of the present invention is the provision in the fluorescent detection apparatus of a reaction chamber that is designed to reduce spurious fluorescence from outside sources. As stated above, reproducible and accurate results in the present apparatus depend on low levels of background fluorescence. This is particularly important in configurations of the apparatus that include multiple sample wells, as in the embodiment described in FIG. 2. Fluorescing contamination, such as flakes of skin or hairs present in the tube-holders, can add differential increments to the background measured in each reaction chamber. Moreover, as is shown below, such background is not constant over the fluorescence spectrum measured, but rather has a characteristic peak fluorescence emission that varies according to the contamination source. While such differential background can be subtracted by measuring a "blank" spectrum for each tube, it significantly reduces the signal-to-noise ratio.

The need for reduction of background fluorescence is particularly important in the context of an analytical thermal cycler (ATC) apparatus, as described above and in co-owned patent application Publication No. WO 9530139. This apparatus combines thermal cycling with optical real time detection of DNA amplification during PCR in a "plate reader" format, so that multiple tubes are cycled and monitored simultaneously. It has been found that tube-holder contamination such as from spilled sample or skin flakes can add intensity to individual signals.

In experiments carried out in support of the present invention, it has been found that background attributable to contamination within the tube-holder can be significantly reduced by carrying the reaction out in a tube that is textured in the region supported by the tube-holder walls. In the context of the present invention "texturing" implies surface characteristics that impart cloudy or translucent optical transmission properties to the tube, and that can be defined surface roughness and peak density properties.

More specifically, the surface roughness and peak density properties of the tube are such as to significantly reduce background fluorescence detected by the detector in the above apparatus, in response to spurious, background fluorescence emission related to contamination on the tube holder wall portion. As will be seen below, surface roughness, measured by average depth of "valleys" forming the texture, is preferably 0.0002 to 0.003 inch (0.2 to 3 mils) and more preferably, less than 0.001 inch (1 mil). Preferred peak density is 50 to 500 peaks/0.5 inch line, more preferably 200-500 peaks/0.5 inch line. Surface roughness characteristics can be measured by conventional methods. For example, peak density, expressed as peaks/0.5 line inch, and average valley depth, measured in inches, can be measured using a profilometer device, such as a Hommel T-1000 Profilometer (Tubingen,



Germany)), in which a stylus is run over the surface. In the context of the present invention, such profilometer measurements may be difficult to make, since the preferred tubes are both curved and small. However, it will be appreciated that an estimate of the texture of a tube used in the present invention can be made by forming a flat textured surface from an analogous mold or forming a flat surface texture by an analogous process to that process used to form the tube texture, then measuring the resulting peak and valley profile, as discussed above. This measurement will provide an estimate of the roughness or texturing parameters of the tube.

It is appreciated that such background emission could also be eliminated by employing a completely opaque tube, i.e., not capable of transmitting light, to serve the objective of substantially reducing background emissions; however, for the particular purpose of using the tubes for reaction mixtures, the translucent feature provides the advantage that the presence of sample or reaction mixture in the tube can be visually or electronically monitored. Translucent or textured tubes made in accordance with the present invention significantly reduce background fluorescence in comparison to the background fluorescence measured from a comparable clear tube or from the sample well itself.

Generally, tubes formed in accordance with the present invention will be molded from plastic, such as polypropylene or polycarbonate. These plastics are commonly used in PCR analysis, because they are inert and do not promote non-specific binding of biological samples. However, it is appreciated that any material having the general optical and chemical properties described above will be appropriate for use in forming such tube.

The entire tube may be textured to adapt to a variety of sample holder configurations; however, the textured portion of the tube will be at least that portion that is in contact with the sample portion of the tube. Minimally, the textured portion will include any regions from which external fluorescence can be detected, according to the geometry of the detection means present in the fluorescence monitoring apparatus in which the tube is used.

The textured region of the tube can be formed in one or more of a number of means. Results from experiments carried out in support of the present invention using tubes having textured regions formed by different methods are provided in Tables 1 and 2 below. Each tube was placed in an empty well of an analytical thermal cycler (ATC) having multiple reaction chambers as described above. The data shown in Table 1 are from tubes were placed in a well (well 51) known to be moderately contaminated with fluorescing contamination. A fluorescence spectrum taken of the well indicated that the fluorescence maximum for the contamination was at the bin 12 region of the CCD sampling device of the ATC. This region

represents light of a wavelength of about 544 nm. At this region, the empty well fluoresced 1300 A/D units of light (an A/D unit is a relative unit of fluorescent light intensity; any units can be used in such measurements, so long as they form a continuum between appropriate blank (closed shutter darkness) and 100% transmittance values). Test sample tubes were individually placed in the well and light emission recorded. Values obtained are shown in Table 1 as Average Signal Intensity relative to a closed shutter condition in which no excitatory light was transmitted to the tube and as percent Transmitted Light, where 100% is defined by the amount of light emitted by the well in the absence of the tube.

Table 2 shows transmission values from a well (well 50) known to be highly contaminated (2769 A/D units of light in the absence of a tube). Tables 1 and 2 show that standard polypropylene tubes either slightly enhanced transmission of light from contamination sources (Table 1) or slightly reduced it (Table 2), depending on the amount of contamination present.

As shown by the data presented in Tables 1 and 2, various texturing means are effective to produce texturing characteristics that significantly block emissions of light emanating from contaminated sources in the wells. For comparative purposes, a tube made translucent by inclusion of titanium dioxide in the polypropylene during polymerization of the polymer forming the region was also tested. Such tubes were more effective than clear tubes in reducing contamination-source light transmissions (Table 2), but less effective than textured tubes.

Table 1

Tube/Condition	Average Signal Intensity (A/D units @ bin 12) (Values Adjusted so Shutter Shut = 0)	Percent Transmitted Light
Shutter Shut	0	0%
Chemical Etched Texture	901	69%
EDM Etched Texture	1038	80%
Sandpaper Roughened	1143	88%
Titanium Dioxide Filled	1322	102%
Clear Tubes	1482	114%
Empty Well	1300	100%

Table 2

Tube/Condition	Average Signal Intensity (A/D units @ bin 12) (Values Adjusted so Shutter Shut = 0)	Percent Transmitted Light
Shutter Shut	0	0%
Chemical Etched Texture	1393	50%
EDM Etched Texture	1584	57%
Sandpaper Roughened	1603	58%
Titanium Dioxide Filled	1855	67%
Clear Tubes	2272	82%
Empty Well	2769	100%

Without committing to an underlying mechanistic theory for the invention, it is noted that such texturing scatters light impinging upon the surface of the tube, and prevents or reduces the amount of light that is directed to the tube interior from outside sources within the tube-holder.

There are a number of ways of creating texture on the surface of the tube to effect the desired reduction in background fluorescence. In one general embodiment, a molded tube may be cast in a textured mold, which then imparts to the tube a textured, irregular surface. Means for making a textured mold are well known in the art, but generally involve etching the mold, by chemical or physical means, such as discussed below.

Representative etching means include bead blasting of the mold cavity, electron discharge machining of the mold cavity and chemical etching of the mold cavity. It should be noted that all these means are preferably carried out on the mold surface in such a way as to produce texturing on the exterior surface of the tube. Although texturing of the interior surface of the tube will also reduce transmission of light from external fluorescent sources, such interior texturing is less desirable in the context of the present invention, since it may interfere with the reaction or with the ability to quantitatively remove the reaction mixture from the tube.

Etched metal molds suitable for forming textured tubes are made in a number of ways. One conventional means for creating such a mold is to "bead blast" the cavity of the mold. This process removes small pockets of metal from the mold surface by hitting the surface with high velocity particles, such as particles of sodium bicarbonate (baking soda).

An etched mold surface can also be formed by an electron discharge machining (EDM) procedure that removes small pockets of metal from the mold by bombarding it with arcs of electricity. As shown in Tables 1 and 2, using such a procedure, light emitted from the

contamination in the well was reduced by 20% in the moderately contaminated well and by 43% in the highly contaminated well.

The mold may also be etched by chemical etching means. Generally, according to methods well known in the molding arts, a mask is placed on the mold surface in the area of texture. The mold is then dipped into an acid bath which removes metal from the unmasked areas. This process may be used to produce a highly dense irregular surface pattern on the mold surface. This is a particularly effective and controlled means of producing an outer tube texture, in accordance with the present invention.

Mold Tech (Roehlen Industries, Walnut, CA) produces by chemical etching a texture having a specified average thickness as well as defined peaks and valleys. Such textures are well known in the art and are best characterized by their Mold Tech Pattern specification numbers, which are considered industry standards. Table 3 lists a number of exemplary Mold Tech patterns that have been used to form texturing on tubes in accordance with the present invention. The MT-11000 (MT-11003 to MT-11005) series texturing patterns is created by blasting a metal mold with a defined size of grit, such as aluminum oxide. The MT-1055 series is created by acid etching.

Table 3

Mold Tech Pattern Specification	Average Depth of Etch
MT-11003	.000195 inch
MT-11004	.000267 inch
MT-11005	.000477 inch
MT-11006	.001002 inch
MT-11007	.001468 inch
MT-1055-2	.00063 inch
MT-1055-3	.00072 inch
MT-1055-4	.00093 inch
MT-1055-5	.00097 inch
MT-1055	.00145 inch

As shown from the data presented in Tables 1 and 2, tubes from chemically etched molds (MT-1055-5) produced significant reductions in contamination emissions from moderately (31% reduction) and highly (50% reduction) contaminated wells. As discussed above, while it is difficult to precisely measure texturing characteristics of these patterns in the context of the

small tubes prepared for use in the embodiment illustrated, an good estimate of their parameters can be made by preparing analogous flat surfaces using the same mold treatment method, and measuring the average peak density and average valley depth of such surfaces. The MT-1055-5 texture has a peak density of 88 peaks/0.5 inch line and an average thickness (depth of etch) of 0.00097 inch. Other particularly efficacious tubes have been formed from MT-11005, having a peak density of 379 peaks/0.5 inch line and an average thickness of 0.000477 inch, and MT-11006, having a peak density of 283 peaks/0.5 inch line and an average thickness of 0.001002 inch. More generally, it is appreciated that a texture having a peak density of between about 50 and 500 peaks/0.5 inch line and an average thickness of between about 0.0002 and 0.003 inch will be preferred for use in the invention. More particularly, preferred molding patterns for use in PCR reactions have peak densities at the higher end of the range (200-500 peaks/0.5 inch line) and have thicknesses between 0.0004 and 0.001 inch to maximize both depth and heat transfer.

In another general embodiment, the texturing is produced by abrading or roughening the surface, e.g., with abrasive tape or cloth or by rotating brush abrading in the presence of abrasive particles. In experiments carried out in support of the present invention, it was determined that applying sandpaper (240, 320 or 400 grit) to the outer surface of polypropylene tubes produced tubes capable of blocking at least 12% and 42% of contamination related emissions in the moderately and highly contaminated wells, respectively (Tables 1 and 2).

FIGS. 3A and 3B show plan and cross-sectional views, respectively, of a tube 60 formed in accordance with the present invention. The tube illustrated has a total volume of about 200 microliters and is formed of virgin polypropylene having no allowable regrind. The tube may also be formed of a comparable grade of polycarbonate.

As illustrated in FIG. 3A, tube 60 has an upper region 62 and a lower region 64 divided by ridge 66. Ridge 66 is constructed and positioned to allow for placement of the tube in a tube holder, as described above. Upper region 62 is bounded at the top of the tube by lip 65, which circumscribes an upper opening in the tube and which may be imprinted with vendor markings. Lip 65 may be constructed to receive a clear cap, as illustrated in FIG. 1, or the opening may be left open, as illustrated here, to permit transmission of an excitation beam to the sample.

With reference to FIG. 3B, the ridge and other surface relief features visible on the outer surface of tube 60 are not reflected in inner surface 68, which is preferably left smooth to facilitate quantitative sample transfer from the tube. In the embodiment illustrated, it can be seen that the wall thickness of the tube varies between the various regions of the tube. In the

200  $\mu$ l tube 60 illustrated, the wall thickness varies from 0.009 inch in the lower region indicated at 70 to 0.015 inch in the upper portion of tube indicated at 72. The base of the tube 74 is thicker (0.029 inch) to withstand higher pressures, such as are encountered during centrifugation.

5       Returning to FIG. 3A; lower region 64 is shown as a textured surface 76 applied according to Mold Tech pattern MT1055-5 having an average etch depth of 0.00097 inch, as described above. Polypropylene tubes constructed according to the specifications of the tube illustrated in FIG. 3A and having textured or translucent lower regions were tested in placed in a highly contaminated well of an ATC, as described above. Full emission spectra  
10       were recorded for each tube after excitation at 488 nm using a CCD detection system, where bins 1-32 correspond approximately to 500-600 nm emission wavelengths. FIGS. 4 and 5 shows a comparison of spectra recorded from a moderately contaminated well (well 51) and a highly contaminated well (well 50) of an ATC as follows: empty well (diamonds), a tube textured by EDM and displaying high initial fluorescence under a black light (solid triangles),  
15       a clear MicroAmp™ tube (closed circles), a translucent tube containing titanium dioxide (crosses), a tube roughened by sandpaper treatment (open circles), a tube textured by EDM and displaying low initial fluorescence under a black light (crosses), and a tube having chemically etched on its lower surface Mold Tech pattern MT1055-5 (solid squares). The closed shutter readings at are shown as stippled squares in both figures.

20       The following examples illustrate, but in no way are intended to limit the present invention.

#### Example 1

Real time monitoring of PCR  
amplification of DNA encoding Q-actin from  
25       various starting concentrations of target DNA

A 296 base-pair segment of a target DNA encoding human B-actin was amplified by PCR from various starting amounts in the range of  $5 \times 10^3$  to  $1 \times 10^6$  copies of target DNA. The following primers and probe were employed:

30       5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA  
(forward primer)

5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGGT  
(reverse primer)

35       5'-A(FAM)TGCCCT(TMR)CCCCCATGCCATCCTGCGT  
(probe)

wherein "FAM" indicates a fluorescein molecule coupled to the oligonucleotide by reacting an NHS-ester group attached to the fluorescein's 6 carbon with a 5'aminophosphate attached to the 5'terminal deoxyadenosine of the oligonucleotide in accordance with Fung et al., U.S. patent 5,212,304; and wherein "TMRH" indicates a tetramethylrhodamine molecule coupled to the base moiety of the adjacent thymidine via the amino linking agent disclosed by Urdea  
5 et al., U.S. patent 5,093,232.

PCRs were carried out in 0.2 mL MicroAmp tubes (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) with the following components: 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCL 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M each of the nucleoside triphosphates (with dUTP substituted for dTTP in accordance with U.S.  
10 patent 5,035,996 to prevent carryover contamination), 300 nM each of forward and reverse primers, AmpliTaq (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) at 0.05 U/ $\mu$ L. To this mixture was added 5  $\mu$ L Raji DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA) at 10 ng/ $\mu$ L, 5  $\mu$ L probe at 2  $\mu$ M, and 1  $\mu$ L uracil N-glycosylase at 1 unit/ $\mu$ L to bring the reaction volume to 51  $\mu$ L. Heating and cooling cycles were carried out in a model 9600 Thermal Cycler (Perkin- Elmer, Norwalk, CT)  
15 fitted with a sample holder cover containing the sample interface components of the invention. The following temperature profile was employed: hold for 2 minutes at 50°C; hold for 10 minutes at 95°C; cycle through the following temperatures 40 times: 92°C for 15 seconds, 54°C for 15 seconds, 72°C for 1 minute; then hold at 72°C.

FIG. 6 illustrates data showing the emission spectra of the fluorescein and tetramethylrhodamine dyes employed as indicators above and fluorescence due to extraneous  
20 sources in the apparatus.

FIG. 7 illustrates data showing fluorescein fluorescent intensity and tetramethylrhodamine fluorescent intensity as a function of cycle number. The high frequency oscillations in intensity reflect the temperature dependence of the fluorescent emission of the two dyes. An increase  
25 in baseline fluorescence for both dyes between cycles 10 and 28 is a system-based variation. In FIG. 8, which illustrates the ratio of fluorescein-to-tetramethylrhodamine fluorescent intensity from the same data, the system-based variation is eliminated and the RMS of fluctuations in the readout signal, that is, the ratio of fluorescent intensities, is less than 1% of the average magnitude of the measured ratio.

FIG. 9 illustrates data from PCR of the Martin DNA starting from amounts ranging from  
30 5000 target molecules to 10<sup>6</sup> target molecules as indicated in the figure.

While the invention has been described with reference to specific methods and embodiments, it will be appreciated that various modifications and changes may be made without departing from the invention.

## IT IS CLAIMED:

1. Fluorescence monitoring apparatus for measuring fluorescent emission from a sample in response to sample irradiation by an emission beam, comprising
  - 5 an excitation beam source capable of directing an excitation beam into the sample,
  - a tube-holder having a wall portion capable of supporting a tube,
  - a tube for holding the sample, and
  - detection means capable of detecting fluorescent emissions from the sample in the tube,
  - where said tube is textured in the region of the tube supported by said tube-holder wall
  - 10 portion, and the textured region is characterized by a surface roughness and peak density effective to significantly reduce background fluorescence detected by said detection means in response to fluorescence emission related to contamination on the tube holder wall portion.
2. The apparatus of claim 1, wherein said tube-holder is capable of supporting a
- 15 plurality of tubes.
3. The apparatus of any of claims 1 or 2, wherein said tube is formed of a polymer material selected from the group consisting of polypropylene and polycarbonate.
4. The apparatus of any of claim 1 or 2, wherein said textured region of said tube has
- 20 a textured outer surface characterized by a peak density of between about 50 and 500 peaks/0.5 inch line.
5. The apparatus of claim 4, wherein said peak density is between about 200 and 500
- 25 peaks/0.5 inch line.
6. The apparatus of claim 4, wherein the surface roughness is characterized by an average depth of 0.0002 and 0.003 inch.
7. The apparatus of claim 6, wherein the surface roughness is characterized by an
- 30 average depth of less than 0.001 inch.
8. A method for reducing fluorescence background in a fluorescence monitoring apparatus designed for detecting fluorescent emission from a sample contained in a tube, where



the tube is supported by wall portions of a tube-holder in the apparatus, said method comprising

5       texturing the surface region of the tube supported by said wall portion to produce a surface roughness and peak density effective to significantly reduce background fluorescence detected by said apparatus in response to fluorescence emission related to contamination on the tube holder wall portion.

10       9. The method of claim 8, wherein said method comprises detecting fluorescent emission from a plurality of samples contained in a plurality of tubes.

10       10. The method of claim 8, wherein said texturing is effective to produce a texture characterized by a peak density of between about 50 and 500 peaks/0.5 inch line.

15       11. The method of claim 10, wherein said peak density is between about 200 and 500 peaks/0.5 inch line.

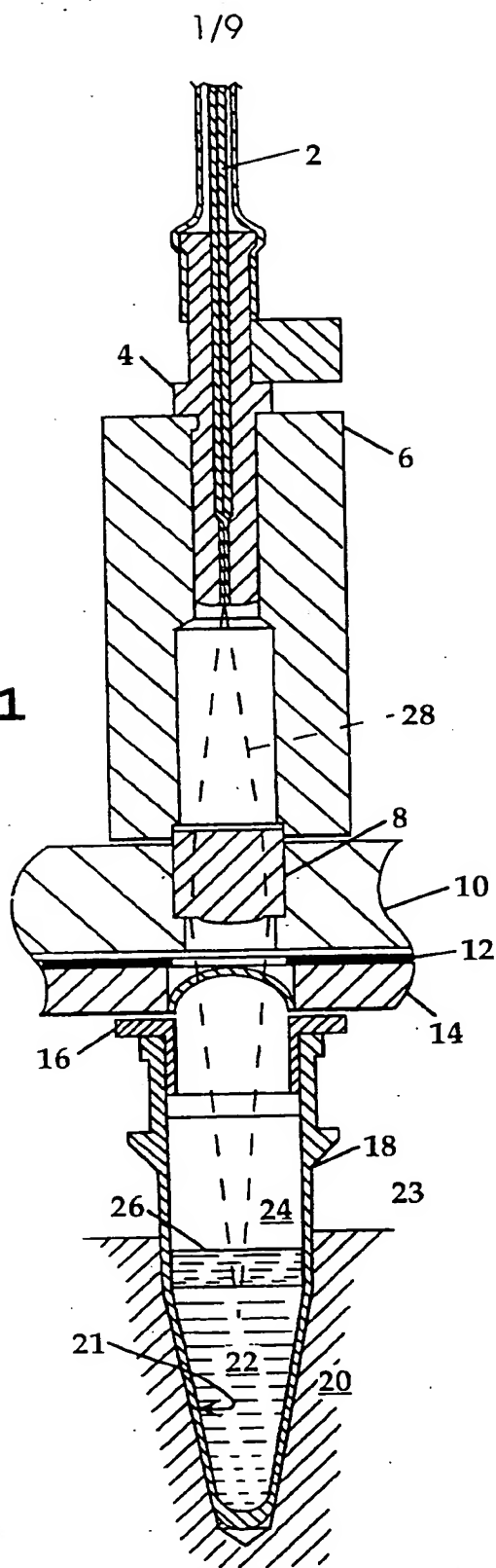
12       12. The method of claim 10, wherein the surface roughness is characterized by an average depth of 0.0002 and 0.003 inch.

20       13. The method of claim 12, wherein the surface roughness is characterized by an average depth of less than 0.001 inch.

25       14. The method of claim 8, wherein said texturing includes casting the tube in a mold having an etched mold surface.

15. The method of claim 8, wherein said texturing includes abrading the tube region.

Fig. 1



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

2/9

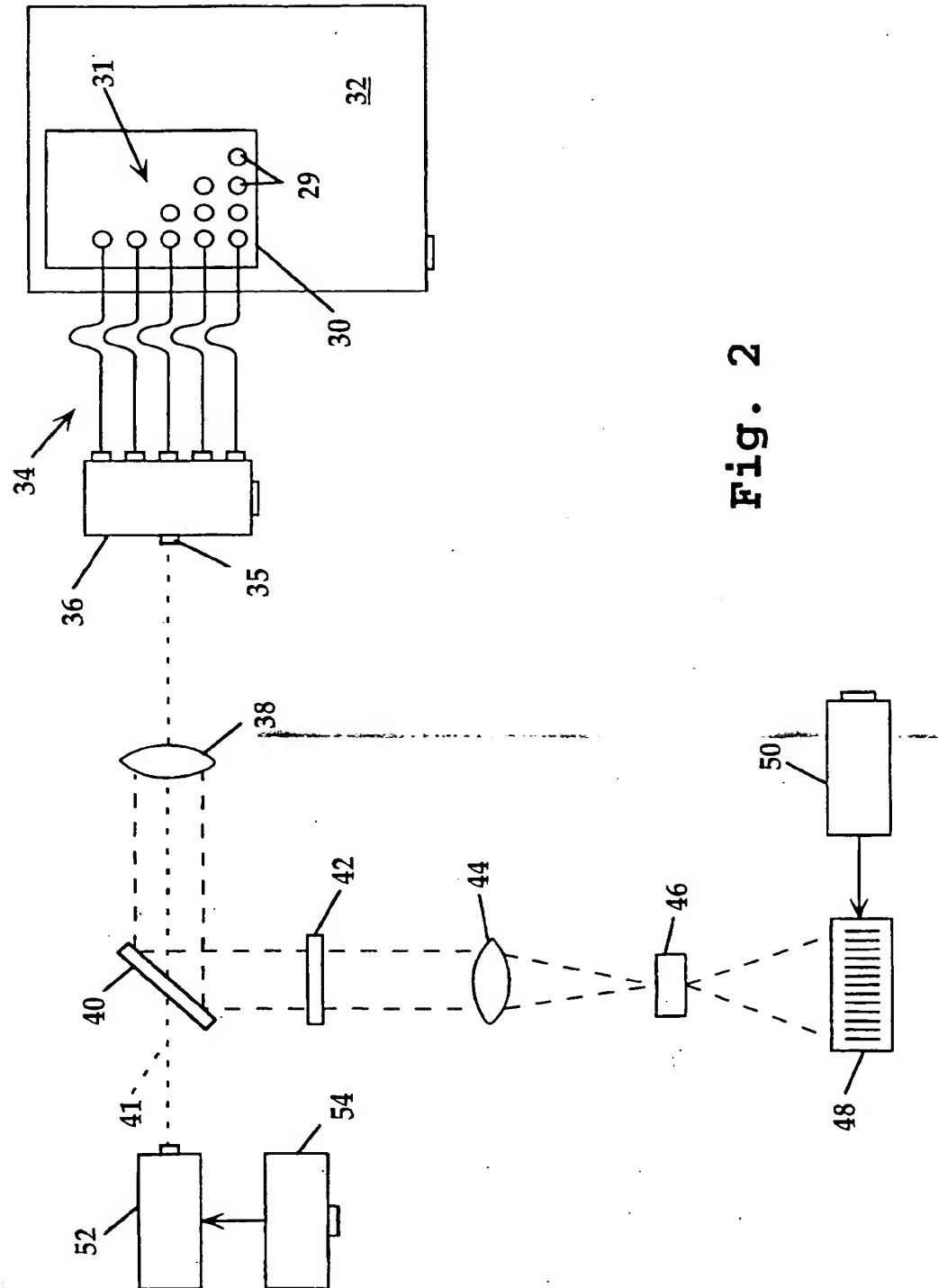
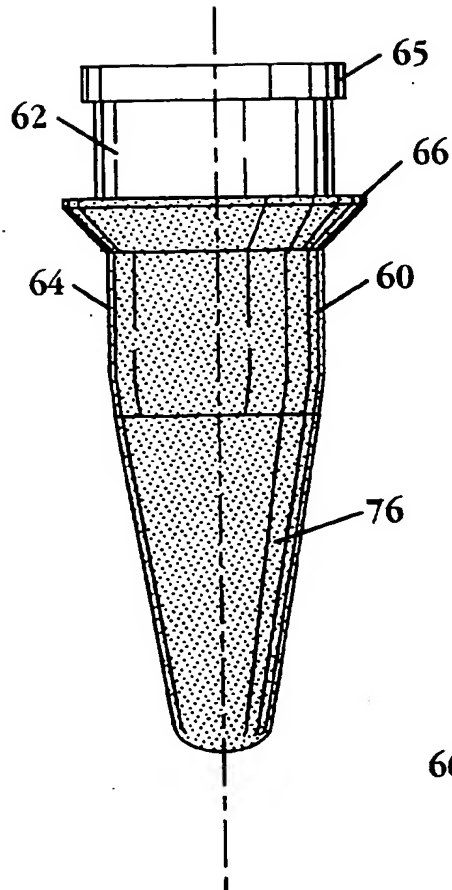
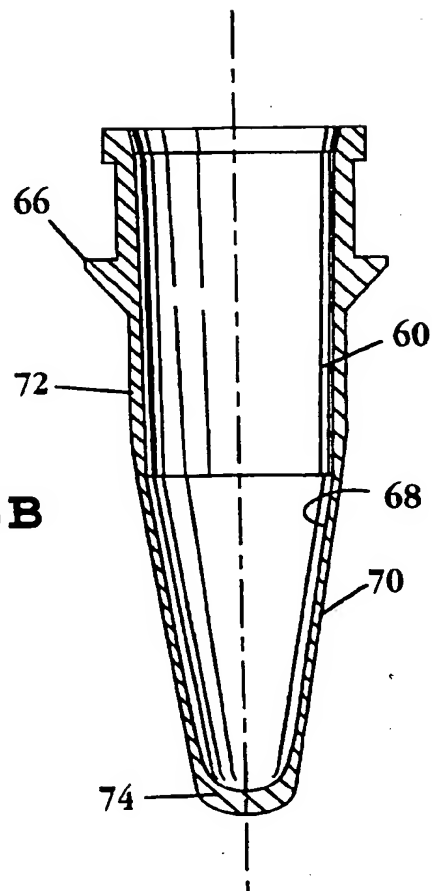


Fig. 2

3/9

**Fig. 3A****Fig. 3B**

4/9

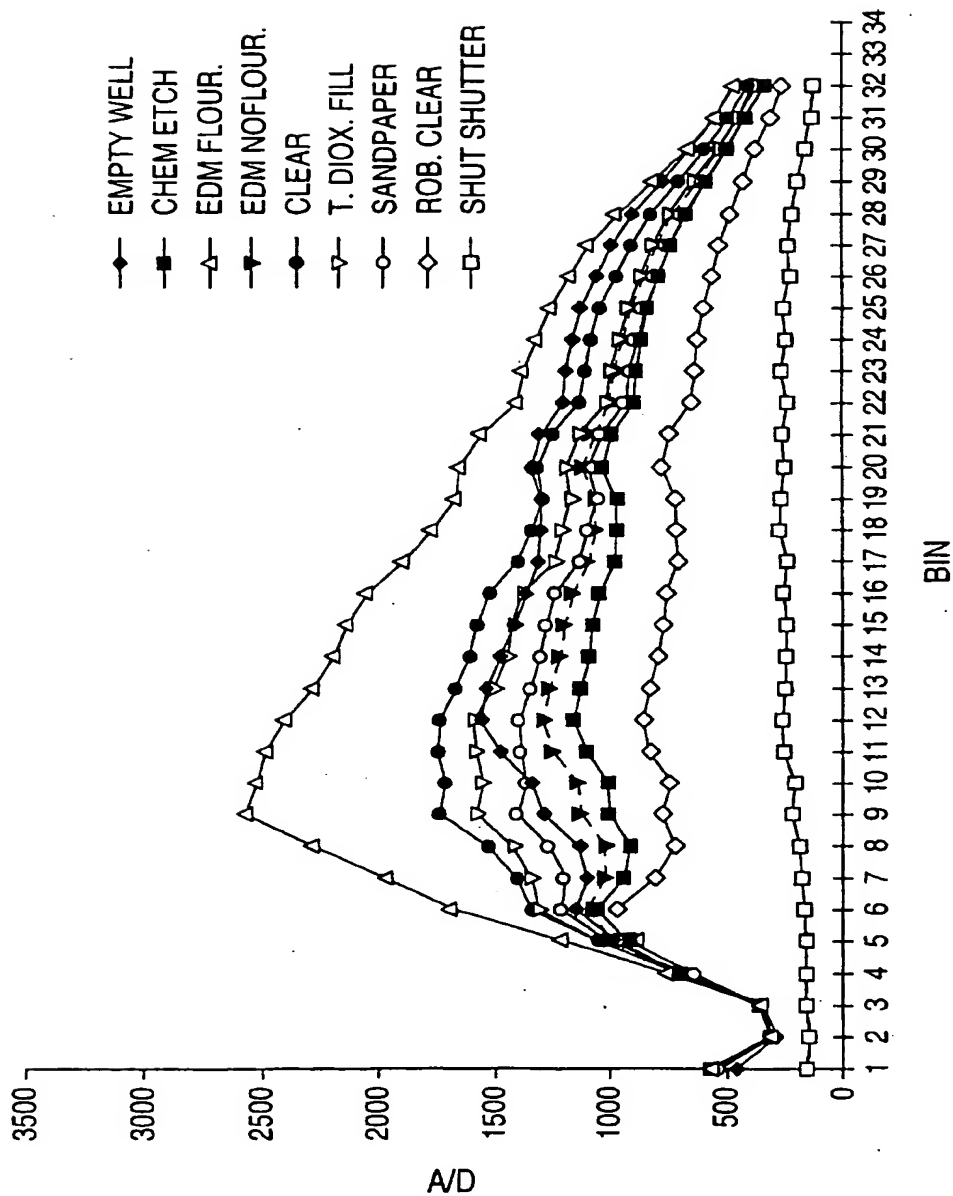


Fig. 4

5/9

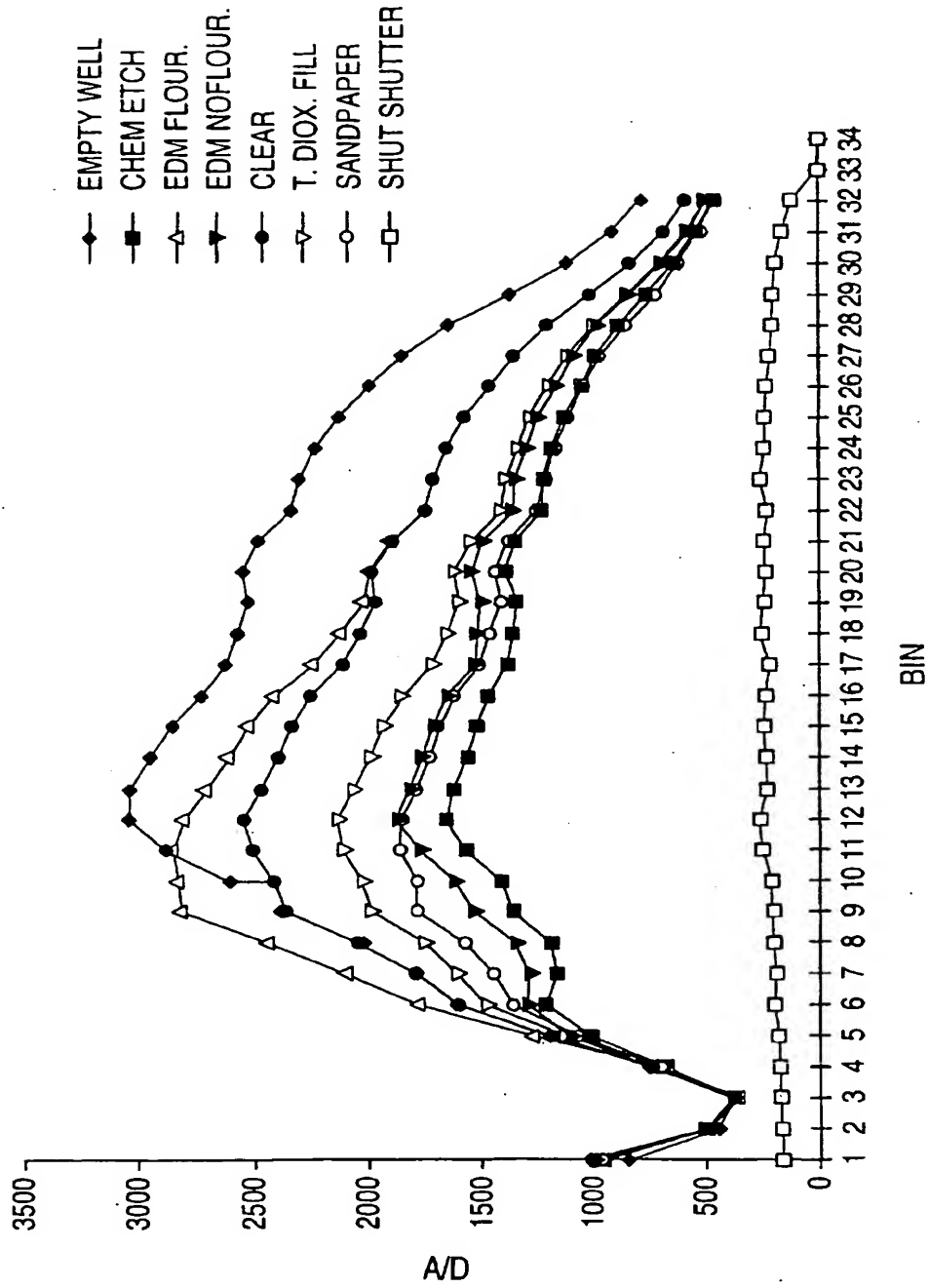
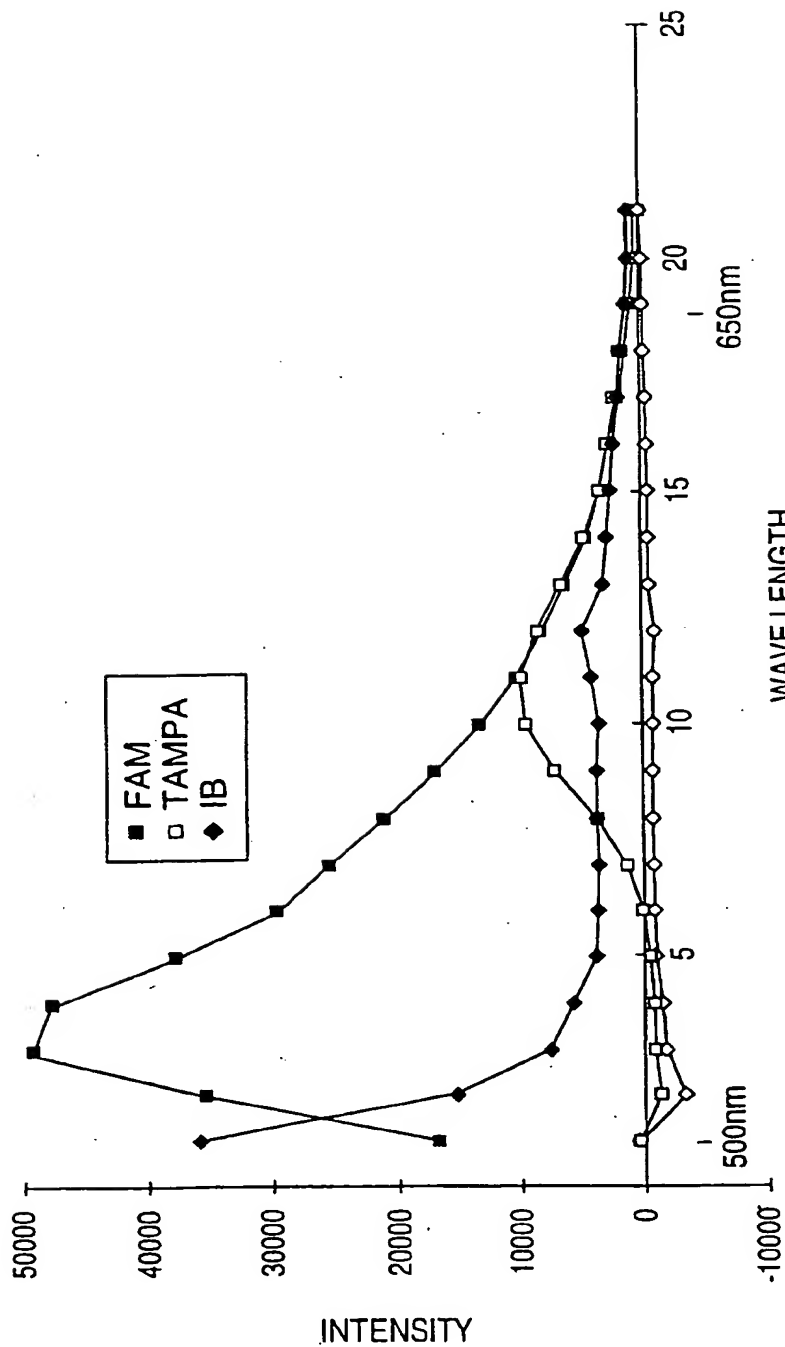


Fig. 5

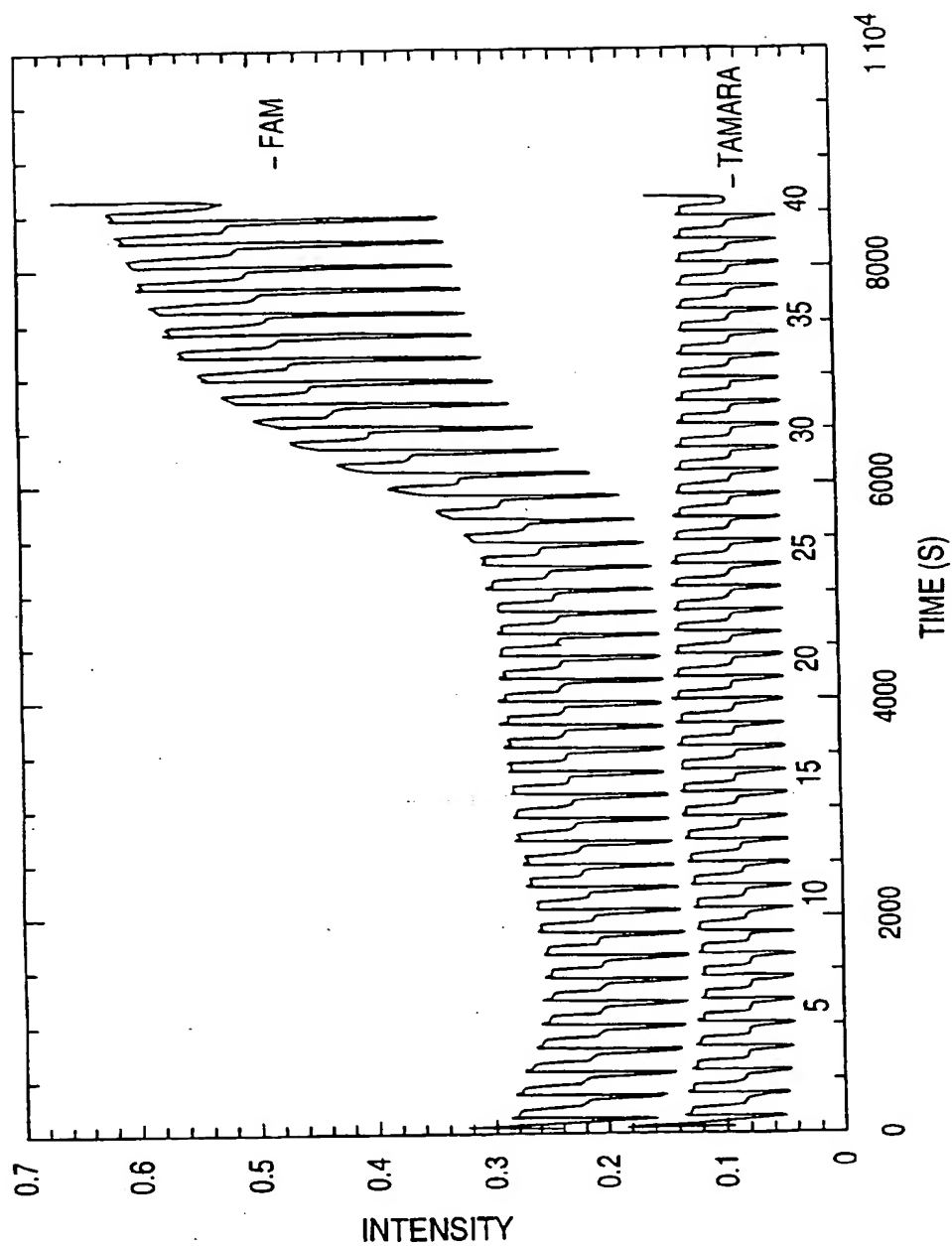
6/9



WAVE LENGTH

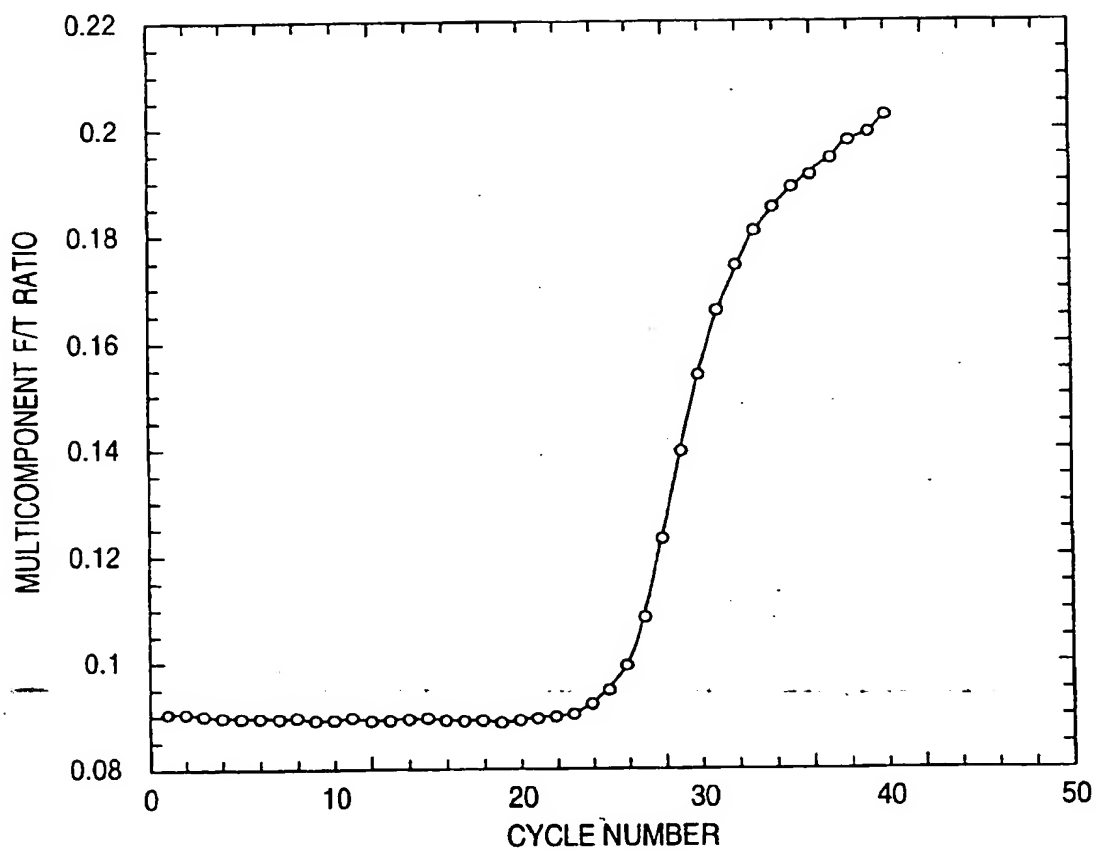
Fig. 6

7/9

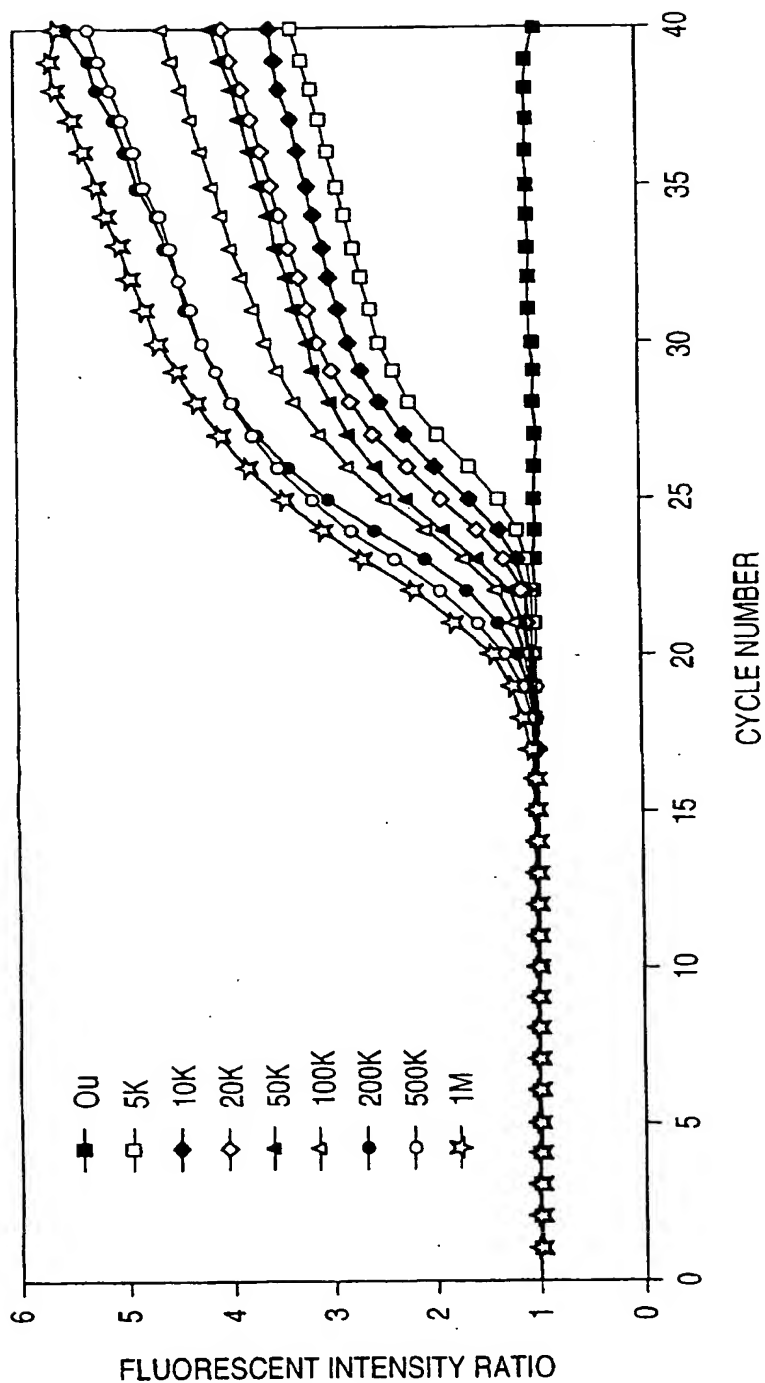
**Fig. 7**



8/9

**Fig. 8**

9/9

**Fig. 9**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No  
PCT/US 96/19238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 G01N21/03 G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 30139 A (PERKIN-ELMER) 9 November 1995 cited in the application see abstract see page 3, line 30 - line 37 see page 7, line 24 - line 28 see page 8, line 1 - line 10 see claims 6,13; figures 1,2	1-3,8,9
Y	WO 90 01168 A (PRECISION SYSTEMS) 8 February 1990 see page 12, line 6 - line 15 see figures 5,6	1-3,8,9
A	EP 0 147 124 A (LABSYSTEMS) 3 July 1985 see abstract see page 3, line 12 - line 24 see figures	1,2,8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \* "E" earlier document but published on or after the international filing date
- \* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\* "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 March 1997

Date of mailing of the international search report

04.04.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo rd,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thomas, R.M.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 96/19238

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>US 4 037 974 A (FLETCHER) 26 July 1977  see abstract  see column 3, line 44 - line 51  see figure 5  -----</p>	1,8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 96/19238

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9530139 A	09-11-95	AU 2389695 A CA 2159830 A EP 0706649 A JP 8510562 T	29-11-95 30-10-95 17-04-96 05-11-96
WO 9001168 A	08-02-90	DE 68915767 D EP 0426729 A JP 3506075 T US 5597733 A US 5229074 A	07-07-94 15-05-91 26-12-91 28-01-97 20-07-93
EP 0147124 A	03-07-85	DE 3474593 A JP 60177245 A US 4684250 A	17-11-88 11-09-85 04-08-87
US 4037974 A	26-07-77	NONE	

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-500232

(43) 公表日 平成11年(1999) 1月6日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

G 0 1 N 21/03  
21/64

識別記号

F I

G 0 1 N 21/03  
21/64

Z

Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 43 頁)

(21) 出願番号 特願平9-521369  
(86) (22) 出願日 平成8年(1996)12月3日  
(85) 翻訳文提出日 平成9年(1997)8月5日  
(86) 国際出願番号 PCT/US96/19238  
(87) 国際公開番号 WO97/21089  
(87) 国際公開日 平成9年(1997)6月12日  
(31) 優先権主張番号 08/568, 606  
(32) 優先日 1995年12月5日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L  
U, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(71) 出願人 ザ パーキン-エルマー コーポレイショ  
ン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404,  
フォスターシティ, リンカーン センター  
ドライブ 850  
(72) 発明者 ラグサ, ロバート ビー.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94022,  
ロスアルトス, ドゥベル ロード 14405  
(72) 発明者 ウォウデンバーグ, ティモシー エム.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94038,  
モスビーチ, ハーバー レーン 120  
(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光学キュベット

(57) 【要約】

発光ビームによるサンプル照射に応答して、サンプルからの蛍光発光を測定するための、改善された蛍光モニタリング装置が開示される。装置は、装置内のチューブホルダーの汚染によるバックグラウンド蛍光発光を実質的に減少させる、表面粗さ特性を有するサンプルチューブを用いる。また、所望の粗さ特性を生み出すために、サンプルチューブをテクスチャーすることによって、そのようなバックグラウンドを減少させる方法も開示される。

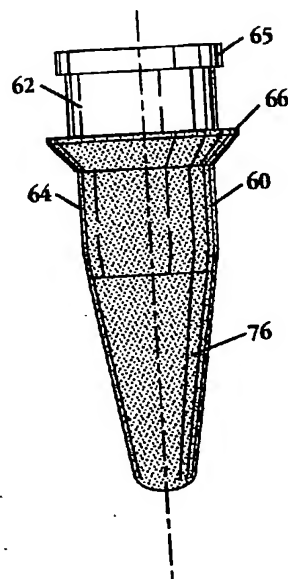


Fig. 3A

## 【特許請求の範囲】

1. 発光ビームによるサンプルの照射に応答したサンプルからの蛍光発光を測定するための蛍光モニタリング装置であって、

サンプル内に励起ビームを指向させ得る励起ビーム源、

チューブを支持し得る壁部を有するチューブホルダー、

サンプルを保持するためのチューブ、および

該チューブ内のサンプルからの蛍光発光を検出し得る検出手段、

を有し、

ここで、該チューブは該チューブホルダー壁部により支持されるチューブの領域内でテクスチャーされ、そして該テクスチャーされた領域は、該チューブホルダーの壁部の汚染に関連する蛍光発光に応答して該検出手段により検出されるバックグラウンド蛍光を、著しく減少させるために効果的な表面粗さおよびピーク密度により特徴づけられる、装置。

2. 前記チューブホルダーが複数のチューブを支持し得る、請求項1に記載の装置。

3. 前記チューブが、ポリプロピレンおよびポリカーボネートからなる群より選択されるポリマー材料から形成される、請求項1または2に記載の装置。

4. 前記チューブの前記テクスチャーされた領域が、0.5インチ直線あたり約50ピークと500ピークとの間のピーク密度により特徴づけられるテクスチャーされた外部表面を有する、請求項1または2に記載の装置。

5. 前記ピーク密度が、0.5インチ直線あたり約200ピークと500ピークとの間である、請求項4に記載の装置。

6. 前記表面粗さが、0.0002インチと0.003インチとの間の平均の深度により特徴づけられる、請求項4に記載の装置。

7. 前記表面粗さが、0.001インチ未満の平均の深度により特徴づけられる、請求項6に記載の装置。

8. チューブ内に含まれるサンプルからの蛍光発光を検出するために設計された、蛍光モニタリング装置内の蛍光バックグラウンドを減少させるための方法であ

って、ここで、該チューブは該装置内のチューブホルダーの壁部により支持され、該方法は、

該チューブホルダー壁部の汚染に関連する蛍光発光に応答して、該装置により検出されるバックグラウンド蛍光を著しく減少させるために効果的な表面粗さおよびピーク密度を生じるために、該壁部により支持される該チューブの表面領域をテクスチャーする工程、

を包含する、方法。

9. 前記方法が、複数のチューブ内に含まれる複数のサンプルからの蛍光発光を検出する工程を包含する、請求項8に記載の方法。

10. 前記テクスチャリングが、0.5インチ直線あたり約50ピークと500ピークとの間のピーク密度により特徴づけられるテクスチャーを生じるために効果的である、請求項8に記載の方法。

11. 前記ピーク密度が、0.5インチ直線あたり約200ピークと500ピークとの間である、請求項10に記載の方法。

12. 前記表面粗さが、0.0002インチと0.003インチとの間の平均の深度により特徴づけられる、請求項10に記載の方法。

13. 前記表面粗さが、0.001インチ未満の平均の深度により特徴づけられる、

請求項12に記載の方法。

14. 前記テクスチャリングが、エッチングされた型表面を有する型内でチューブをキャストする工程を包含する、請求項8に記載の方法。

15. 前記テクスチャリングが、チューブ領域を研磨する工程を包含する、請求項8に記載の方法。



## 【発明の詳細な説明】

## 光学キュベット

発明の属する技術分野

本発明は、蛍光検出システムにおける使用に適した反応容器の分野に関し、特に、核酸増幅産物の蛍光に基づく測定を使用する装置に用いられる反応容器に関する。本発明は、蛍光モニタリング装置における蛍光バックグラウンドを減少させるための方法も含む。

参考文献

- Fungら、米国特許第4,855,225号  
Menchenら、米国特許第5,188,934号  
Bergotら、国際特許出願第PCT/US90/05565号  
Hollandら、Proc. Natl. Acad. Sci., 88:7276-7280 (1991)  
Kargerら、Nucleic Acids Research, 19:4955-4962 (1991)  
KellerおよびManak、DNA Probes, 第2版 (Stockton Press, New York, 1993)  
Leeら、Nucleic Acid Research, 21:3761-3766 (1993)  
Walkerら、Nucleic Acids Research, 20:1691-1696 (1992)  
Haugland, 221-229頁、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 第5版 (Molecular Probes, Inc., Eugene, 1992)  
Glazerら、Proc. Natl. Acad. Sci., 87:3851-3855 (1990)  
Srinivasanら、Applied and Theoretical Electrophoresis, 3:235-239 (1993)  
3)  
Kapuscinskiら、Anal. Biochem., 83:252-257 (1977)  
Hill, Anal. Biochem., 70:635-638 (1976)  
Setaroら、Anal. Biochem., 71:313-317 (1976)  
Lattら、J. Histochem. Cytochem., 24:24-33 (1976)  
Ryeら、Nucleic Acids Research, 20:2803-2812 (1992)

発明の背景

反応産物の蛍光検出は、多くの分析セッティングにおいて一般的である。典型的には、例えば非蛍光物質から構成される光不透過性コンパートメントを提供することによって、外部源からの蛍光を最小化するように設計された反応チャンバが、蛍光反応をモニターするための分析機器に備え付けられる。しかしながら

、そのような予防措置は、サンプル操作の間にチャンバーに導入された髪もしくは皮膚の小片などの汚染源からの蛍光発光を防がないかもしれない。

本発明は、外部源からの蛍光を減少させるために構成されたサンプルチューブを提供する。このチューブは、特にポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの核酸増幅反応において有用であり、反応の経過がモニターされる。

PCRは、クローニング、遺伝子発現の分析、DNA塩基配列決定、遺伝地図作製、薬物の発見などにおける応用にとって最も重要な研究手段となっている（例えば Arnheimら（上記に引用）、Gillilandら、Proc. Natl. Acad. Sci., 87:2725-2729(1990)、Bevanら、PCR Methods and Applications, 1:222-228(1992)、Greenら、PCR Methods and Applications, 1:77-90(1991)、Blackwellら、Science, 250:1104-1110(1990)）。

核酸増幅を行うために多くの機器が開発されてきたが、機器の殆どは基礎的なPCR技術を使用している（例えばJohnsonら、米国特許第5,038,852号（コンピュータ制御熱サイクラー）、Wittwerら、Nucleic Acids Research, 17:4353-4357(1989)（毛管PCR）、Hallsby、米国特許第5,187,084号（空気に基づく温度制御）、Garnerら、Biotechniques, 14:112-115(1993)（864ウェルプレートにおける高スループットPCR）、Wildingら、国際特許出願第PCT/US93/04039号（マイクロ加工構造におけるPCR）、Schnipelskyら、欧州特許出願第90301061.9号（公開公報第0381501号）（使い捨て、単回使用のPCRデバイス）など）。PCR機器開発に必須の、重要な設計目標には、良好な温度制御、多サンプル熱サイクルにおけるサンプル間の変化性の最小化、PCRプロセス工程前後の自動化、高速サイクル、サンプル容積の最小化、増幅産物の同時測定、相互汚染の最小化、もしくはサンプルキャリアオーバーなどが含まれる。

最近では、閉鎖された反応チャンバー内で行われ、同時にモニターされる増幅反応を可能とする機器に、PCR設計の焦点があたっている。閉鎖された反応チャンバーは相互汚染を防ぐのに望ましい（例えば、Higuchiら、Biotechnology, 10:413-417(1992)および11:1026-1030(1993)、ならびにHollandら、Proc. Natl. Acad. Sci., 88:7276-7280(1991)）。同時モニタリングは、特に診断サンプルの

分析（ここでは、高頻度で起こる偽陽性および偽陰性がPCRを基礎とした手順の価値を著しく減じ得る）において望ましい。

さらに、PCRの間の相対濃度値の過程を考慮に入れることによって、近似した濃度の相対値が決定され得るように、PCRの同時モニタリングは、多数の標的増幅における開始標的DNA濃度のはるかに厳密な定量化を可能にする。同時モニタリングはまた、PCRの効率を評価することが可能であり、サンプル中にPCRインヒビターがあるかどうかを示すことができる。

Hollandら（先に引用した）および他の研究者は、PCRの間に増幅産物の同時測定を提供するための、蛍光に基づくアプローチを提案している。このようなアプローチは、存在する二本鎖DNAの量を示すための挿入色素（臭化エチジウムなど）を使用するか、もしくは蛍光体-消光剤対を含むプローブを使用している（いわゆる「Tac-Man」アプローチ）。蛍光体-消光剤対は、濃度が存在する二本鎖DNAの量に比例する蛍光産物を放出するために、増幅の間に切断される。

不運なことに、必要とされる蛍光測定が、非常に高い蛍光バックグラウンドに対して成されなければならないために、これらのアプローチの実行の成功は妨げられてきた。それにより、加熱および冷却サイクルの間のチャンバー内での結露の形成、光路における気泡の形成、溶液中の粒子もしくはデブリ、サンプル容積の差違、およびそれによるシグナル発光および吸光度の差違などのような、機器のノイズの些細な供給源でさえ、蛍光シグナルの信頼性のある測定を妨げてきた。

共通所有の特許出願公報第W0 9530139号は、入手可能な任意の核酸増幅スキームから生じる増幅産物の蛍光指示薬の、安定した信頼性のある同時測定を提供する装置を記載している。この装置は、励起ビームを蛍光混合物に指向させることによって作動し、励起ビームは、混合物内に存在する蛍光の中心を励起するため

の適切なエネルギーを有する。本発明は、この装置を改善することに関し、外因性の蛍光の量を減少させることによって、テストサンプルから測定されたバックグラウンド蛍光を減少させる反応チューブを用いることを含む。外因性の蛍光は、装置チューブホルダー内に存在する汚染などの外部源からチューブに浸入する

。本明細書中で特に記載されるように、チューブは不規則なもしくは粗い外部表面を有したプラスチック消耗チューブであり、外部表面はチューブの外部から発せられる入射蛍光発光を偏向もしくは散乱させる。しかしながら、使用者がチューブ内に含まれる流体の容積を視覚化できるように、チューブが十分に透過った状態のままであることがまた好ましい。さらに、チューブはシール可能であり、そしてチューブに保持されたサンプルに励起ビームを透過させる、限定された透明な窓領域を提供し得る。

上述したチューブは、共通所有の特許出願公報第W0 9530139号に記載されるようなPCRモニタリング装置での使用に特に適しており、このようなチューブが光発光の検出を測定する他の機器での使用、および特にそのような測定が「プレートリーダー」形式において行われる機器での使用に適していることが、認められ得る。

#### 発明の要旨

1つの局面において、本発明は、発光ビームによるサンプル照射に応答して、サンプルからの蛍光発光を測定するための蛍光モニタリング装置を包含する。この装置は、サンプルに励起ビームを指向させ得る励起ビーム源、チューブを支持し得る壁部を有するチューブホルダー、サンプルを保持するためのチューブ、およびチューブ内のサンプルからの蛍光発光を検出し得る検出器を有している。典型的にポリカーボネートもしくはポリプロピレンから形成されるチューブは、前述のチューブホルダー壁部によって支持されるチューブの領域内でテクスチャーされる。テクスチャーされた領域は、検出器によって、チューブホルダー壁部上の汚染に係る蛍光発光に応答して検出されるバックグラウンド蛍光を著しく減少させるのに効果的な表面粗さおよびピーク密度によって特徴づけられる。

好適な実施態様において、このチューブは、0.5インチ直線あたり約50ピークと500ピークとの間、より好ましくは0.5インチ直線あたり200ピークと500ピークとの間のピーク密度によって特徴づけられる、テクスチャーされた外部表面を有する。好適な実施態様においてはまた、表面粗さは、0.0002と0.003インチ、より好ましくは0.001インチより少ない平均深度によって特徴づけられる。

関係する局面において、本発明は、チューブ内に含まれるサンプルからの蛍光発光を検出するために設計された蛍光モニタリング装置における、蛍光バックグラウンドを減少させるための方法を包含し、ここでこのチューブは装置内のチューブホルダーの壁部によって支持される。この方法は、チューブホルダー壁部上の汚染に係る蛍光発光に応答して、装置によって検出されるバックグラウンド蛍光を著しく減少させるのに効果的な表面粗さを生み出すために、壁部によって支持されるチューブの表面領域をテクスチャーすることを含む。

1つの一般的な実施態様において、表面のテクスチャリングは、エッチングされた型表面を有する型内でチューブをキャストすることによって、生み出される。他の実施態様においては、チューブの外部表面領域は、上記のような所望の粗さ特徴を形成するために、例えば研磨紙を用いた処理によって研磨されている。

本発明のこれらおよび他の目的および特徴は、後述の本発明の詳細な説明を、添付する図面と共に読むことによって、より十分に明らかとなる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、改善された反応容器を含む、本発明の装置のサンプルインターフェース構成部品を概略して示している。

図2は、光ファイバマルチプレクサーを介して連続的に信号を送る反応によって、複数の増幅反応を同時にモニターするために形成された、本発明の装置を概略して示している。

図3Aは、本発明による光学チューブの側面図を示す。

図3Bは、図3Aで示されたチューブの断面図を示す。

図4は、種々のチューブに合うように作られたATC装置内の、中程に汚染されたウエルから測定された発光スペクトルを示す。

図5は、種々のチューブに合うように作られたATC装置内の、高度に汚染されたウエルから測定された発光スペクトルを示す。

図6は、テトラメチルローダミン蛍光指示薬、フルオレセイン蛍光指示薬、および後述する好適な実施態様のCCDアレイによって記録された機器バックグラウンドについて、スペクトルで分けた蛍光強度データを示す。

図7は、増幅産物（第1の蛍光指示薬）に比例したフルオレセイン色素、および典型的PCRの間、第2の蛍光指示薬として用いられたテトラメチルローダミン色素からの蛍光シグナルの時間依存性を示す。

図8は、時間依存性のデータが図6で示されている同一のPCRからの、フルオレセインおよびテトラメチルローダミン色素の強度の比率のサイクル依存性を示す。

図9は、同一の標的核酸の異なる開始濃度を有する、別々のPCRの増幅産物の量とサイクル数とを関係づけるデータを示す。

### 発明の詳細な説明

#### 1. 定義

本明細書中で蛍光シグナルに関して用いられる用語「安定な」は、ノイズによるシグナルにおける2乗平均（RMS）偏差が、平均シグナルの大きさの2パーセント以下であるということを意味する。より好ましくは、「安定な」は、ノイズによるシグナルにおけるRMS偏差が、平均シグナルの大きさの1パーセント以下であるということを意味する。

「粗さ」は、表面上での山から谷までの距離の尺度であり、そして通例、線に沿った基準面の上および下の絶対距離の算術平均値として表される。粗さの関係する尺度は、表面平面の下部のテクスチャーを形成する谷の平均深度である。

別の表面テクスチャー特質は「頂点密度」もしくは「ピーク密度」であり、一定の表面積におけるピーク密度の尺度を提供する。粗さおよびピーク密度は共に、プロフィールメーターを用いて測定され得る。

### II. 同時検出装置

#### A. 装置

本発明は、共通所有の特許出願公報第W0 9530139号（参考として本明細書中に援用される）に記載されるように、核酸増幅反応の経過を、同時にモニターするための蛍光に基づく装置を含む。装置と共に用いられる増幅スキームのタイプは重要でないが、一般的に装置は、エキソヌクレアーゼ活性を有する核酸ポリメラーゼもしくは2本鎖DNAの集団を用いることのいずれかを必要としており、2本

鎖DNAの集団は、モニターされる反応の経過の間に増加する。具体例としての、本発明の装置とともに用いられ得る増幅スキームは、PCR、リガーゼ連鎖反応（LCR）のようなリガーゼに基づく増幅スキーム、Qベータレプリカーゼに基づく増幅スキーム、Walkerらによって記載されるような鎖置換増幅（SDA）スキームなどを含む。核酸増幅スキームの包括的な記載は、KellerおよびManakのDNA Probes, 第2版 (Stockton Press, New York, 1993)によって提供されている。装置の基本は、第1の蛍光指示薬および内部標準（本明細書中では第2の蛍光指示薬という）の蛍光強度の比率の測定である。第1および第2の蛍光指示薬は、スペクトルで分析できなくてはならない。つまり、別々の発光スペクトルは、個々の発光ピークが複合されたスペクトルで観察されるように、十分に非重複でなければならない。明らかに装置は、例えば、単一の反応において幾つかの標的核酸の同時増幅をモニターするために、複数の第1の蛍光指示薬を含むように一般化され得、そうすることにより、複数の蛍光強度の比率がモニターされる。そのような実施態様での使用に適した、幾つかの、スペクトルで分析可能な色素が、Fungらの米国特許第4,855,225号、Menchenらの米国特許第5,188,934号、Bergotらの国際特許出願第PCT/US90/05565号および同様の参考文献に開示されている。

装置は、励起ビームをサンプルに指向し得る励起ビーム源を含む。好ましくは、このビーム源は、サンプルインターフェースの一部であり、つまり操作上、閉鎖された反応チャンバーに結合された光学構成部品であり、反応混合物に励起ビームを集束させ、そして結果として生ずる蛍光を集めるためのレンズ、ならびに光源からレンズへと励起ビームを伝達するため、およびレンズから検出分析手段へと蛍光シグナルを伝達するための光ファイバーを包含する。好ましくは、反応混合物は、相互サンプル汚染もしくはいわゆる「キャリーオーバー」を防ぐために、閉鎖されたチューブのような閉鎖された反応チャンバー内に入れられる。レンズ

は、励起ビームを集束させ、そして閉鎖された反応チャンバーの壁の一部を經由して蛍光を集める。

上述したように、好適な反応チャンバーは、例えば従来の200  $\mu$ l「Eppendorf<sup>T</sup>

M」チューブの外形を有するチューブである。チューブは、反応混合物が添加された後に、チューブの開放端にキャップを取り付けることによって密閉され得る。図1で透明なキャップとして示されるように、PCRのためのサンプルインターフェースの好適な実施態様において、レンズは励起ビームを指向して、チューブ内の透明な開口部を経由して蛍光を集める。本発明の重要な局面によれば、バックグラウンドの読みとりを減少させる光学特性を持つように、反応チューブは製造される。本発明のこの局面は、下記のB部で詳細に説明される。

図1で示される実施態様において、第1端の光ファイバー2は、レンズ8と同軸配置の口輪4、ハウジング6、およびプレート10によって保持されている。該光ファイバー2（図示せず）の第2端は、操作可能に、光源および検出分析手段に連係されており、下記でより十分に説明される。光ファイバー2の端部フェースとレンズ8との間の距離は、光ファイバーの開口数、チューブ18の外形、レンズ8の焦点長、レンズ8の直径などを含むいくつかの要素によって決定される。特定の実施態様における、このような変数の値を選択する指標は、例えばOptics Guide 5(Melles Griot, Irvine, CA, 1990)または同様の参考文献の、光学設計についての標準的なテキストに容易に見いだされる。図示された実施態様において、レンズ8は8mmの直径を持ち、そしてEdmund Scientific(Barrington NJ)から入手可能な、材料BK7から構成されている。光ファイバー2は、0.2の開口数を有する。好ましくは、設計は励起ビーム28の反応混合物22への最大透過を可能とする。例えば、レンズ8、光ファイバー2の開口数、および光ファイバー2の端部とレンズ8との間の距離は、レンズ8の直径が励起ビーム28の直径と等しいかもしくは上回り、ビーム28がレンズ（図1で示すように）に衝突するように、選択される。励起ビーム28は、チューブ18のキャップ16、空隙24、および反応混合物22の上表面26を経由して、例えば、表面26の1~3mm真下で、光ファイバーの直径の約1~3倍の領域へと集束される。チューブ22は、チューブホルダー23内に位置している。集束の度合いは、実施態

様の重要な特徴ではなく、サンプルインターフェースを、市販の熱サイクラーのサンプルホルダーの外形および寸法に適合させた結果である。他の実施態様にお



いては、外形および寸法は、反応混合物へのより鋭い集束を可能にし得る。

装置のレンズは、特定の実施態様およびテストされるべきサンプルの所望の外形に応じて、多様な形状を有し得る。例えば、レンズは球形、切頭の球形、円柱、切頭の円柱、扁球、もしくは切頭の扁球などであり得、そしてHlousekの米国特許第5,037,199号、Hoppeらの米国特許第4,747,87号、Moringらの米国特許第5,239,360号、Hirschfieldの米国特許第4,577,109号または同様の参考文献によって開示されるような、いずれの適した透明な屈折性材料からも構成され得る。

図1を続けて参照すると、励起ビーム28に应答して、反応混合物22によって発せられた発光蛍光は、励起ビーム28によって規定された光路とほぼ同じ光路に沿って、レンズ8によって集められる。発光された光は、下記の装置の光学分離および分析構成部品への透過のために、光ファイバー2の端部に集束される。説明したビーム源および集束構成部品はまた本明細書中で、サンプルに励起ビームを指向し得る励起ビーム源として言及されている。

好適な実施態様において、サンプルインターフェースはまた、反応混合物構成成分の結露からの励起ビームおよびシグナルの散乱および／または吸収による変化性を減少させるために、光学透過に使用される反応チャンバーの壁の部分を加熱するための手段をも含む。図1に示される実施態様において、光学透過のために用いられる反応チャンバー（チューブ18）壁の部分は、チューブキャップ16である。従って、加熱素子12および伝熱プラテン14は、キャップ16を加熱するために用いられる。好ましくは、加熱素子12は、抵抗加熱素子、およびキャップ16の温度のプログラム制御を可能とする温度センサを含有する。キャップ16は、反応混合物の構成成分の凝縮点より上の温度で維持される。一般的に、キャップ16は、94℃から110℃の範囲内の温度で維持され得る。一般的に、反応混合物の主要溶媒は通常水であるため、好ましくは、キャップ16は約102℃から約105℃の範囲内の温度で維持される。より好ましくは、キャップ16は、103℃で維持される。好ましくは、熱サイクリングを用いた実施態様において、上記のキャップ加熱構成部品は、反応混合物22の温度を周期的に制御するため

に用いられる伝熱ブロック20から熱的に遮断されている。ブロック20は、1つ以上のチューブホルダーを規定しており、ホルダー21が壁部23を有するように、各ホルダーはチューブ18のようなチューブを支持し得る壁部を有している。下記のように、チューブホルダーの壁部は、装置内で偽の蛍光発光を引き起こし得る表面汚染物質を有し得る。

上記の構成部品のために適切な材料を選択することは、通常の機械エンジニアの技術の範囲内である。材料選択のための代表的な基準には、(i)特に熱サイクリングを用いる増幅スキームのための熱膨張度、およびその光学構成部品のアラインメントへの効果、(ii)用いられた励起波長および蛍光物質(fluorophore)発光波長の光学透過特性、(iii)反応混合物の構成成分に関しての反応チャンバーの化学的不活性、(iv)例えばポリメラーゼ、標的核酸の重要な反応構成成分が、チャンバー壁に吸着する傾向の度合い、(v)光路における蛍光材料の最少化などを含む。典型的には、増幅反応混合物を入れたチューブは、ポリプロピレン、ポリカーボネート、もしくは同様の材料によって作製される。

図1に示すサンプルインターフェースは、個々に用いられ得るか、もしくは図2で概略図を示すように、単一機器における複数の同一インターフェースの1つとして用いられ得る。図示された実施態様において、ブロック30(例えば、Mossaらによる欧州特許出願第91311090.4号、公開公報第0488769号に記載されるような、熱サイクラー32と結合した加熱ブロックであり得る)内のチューブホルダー29に配列された個々のサンプルインターフェース31は、光ファイバー34によって、光ファイバーマルチプレクサー36に接続されている。光ファイバーマルチプレクサー36は、例えば使用者の制御のもとでプログラムされたマイクロプロセッサを介して、個々の光ファイバーとポート35との間の透過を選択的に可能にする。

好適な配置において、光源52およびコントローラー54により発生した励起ビーム41は、ビームスプリッター40を経由し、そしてレンズ38によってポート35上に集束される。そこで励起ビームは、光ファイバーマルチプレクサー36によって、光ファイバー34の予め決定したセットもしくはサブセットのそれぞれに、連続的に指向される。逆に、図1に示すサンプルインターフェースを

参照すると、反応チャンバーで発生した蛍光シグナルは、レンズ8によって集められ、そして光ファイバー上に集束される。光ファイバーは次に、おそらくは光ファイバーマルチプレクサーを介して、シグナルを検出分析手段に伝達する。図2に戻ると、サンプルインターフェースによって集められた蛍光シグナルは、光ファイバーマルチプレクサー36に指向され、そこでポート35から出、そしてレンズ38によって集められ、そして平行にされる。レンズ38は、蛍光シグナルをビームスプリッター40に指向して、ビームスプリッター40は次に、カットオフフィルター42を経由して選択的にシグナルを指向して、励起ビームからの光が、シグナル検出構成部品に到達することを防ぐ。ビームスプリッター40は、励起ビームを通過させるための開口を備えた、十分な反射鏡である従来の二色性鏡（例えば、米国特許第4,577,109号に開示されている）、もしくは同様の構成部品であり得る。カットオフフィルター42を通過した後、蛍光シグナルはレンズ44によってスペクトル分析器に指向される。スペクトル分析器は、蛍光シグナルをスペクトルで分離し、そしてシグナルの複数のスペクトル構成成分の強度を測定する。典型的には、スペクトル分析器は、蛍光シグナルをスペクトル構成成分に分離するための、プリズム、回折格子のような手段、およびダイオードアレイ、電荷結合素子（CCD）装置、帯域フィルターのアレイ、および光電子増倍管など光検出器のアレイなどを含有している。図2に示す好適な実施態様において、スペクトル分析器は、回折格子46（例えば、Jobin-Yvon、NJのモデルCP-140）、およびCCDコントローラー50に連結されたCCDアレイ48（例えば、Princeton Instruments、NJのモデルS2135）を含有する。

フルオレseinおよびテトラメチルローダミンからの蛍光シグナルの分析のために適切な典型的なCCDアレイは、スペクトルの500nmから650nmの領域の範囲にわたる21個の収集ピンに分割される。各ピンは、8.5nm領域を越える光を集める。当業者は、多くの代替の配置がまた、実質的に同じ最終結果を達成するために使用され得ることを認識する。スペクトル分析のためのCCDアレイの典型的な適用が、Kargerら、Nucleic Acids Research, 19: 4955-21962(1991)により記載される。チューブ内のサンプルからの蛍光発光を検出するための上記の構成成分をまた、集合的に本明細書中で検出手段という。

スペクトル分析により集められたデータに基づく蛍光シグナルの分析が所望される。なぜなら、1つ以上の第1の蛍光指示薬および第2の蛍光指示薬によるシグナルの構成成分は、例えば、複数のビームスプリッター、フィルター、および光電子増倍管に基づく装置内の整備不良により生じ得る波長特異的な装置の変化性を導入することなしに、強度比を計算すると同時に分析され得るからである。スペクトル分析器はまた、「虚像のフィルター」または光検出器のアレイから得られるデータのプログラムされた操作の使用を可能にする。ここで複数の分離した波長範囲が、関連するマイクロプロセッサを介したプログラム可能な制御下で（物理的な帯域フィルターとの類似性において）標本とされる。この能力は、第1および第2の蛍光指示薬である色素の選択における高度な柔軟性を可能にする。

一般に、検出および分析手段は、第1および第2の蛍光指示薬により生じるシグナルの強度比を反映する出力を提供する任意の検出装置であり得る。このような装置は、米国特許第4,577,109号および同第4,786,886号、ならびにThe Photonics Design & Applications Handbook, 第39版(Laurin Publishing Co., Pittsfield, MA, 1993)のような参考文献に例示されるように、当該分野において周知である。

好ましくは、本発明の装置は、PCRをモニターするために使用されるが、種々の他の増幅スキーム（例えば、LCR）が使用され得る。PCRを行うための記載および指標が、この主題の多くの論文（例えば、Innisら(前述)、およびMcPhersonら(前述)を含む）において提供される。簡単には、PCRにおいて、2つのオリゴヌクレオチドが、DNAポリメラーゼに触媒される一連の合成反応のためのプライマーとして使用される。代表的には、これらのオリゴヌクレオチドは異なる配列を有し、そして(i)鋳型（すなわち標的）DNAの反対の鎖上にあり、そして(ii)増幅されるべきDNAセグメントの側面にある配列に相補的である。標的DNAは、最初に、大モル過剰の2つの各オリゴヌクレオチドおよび4つのデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)の存在下で、加熱することにより変性される。次いで反応混合物を、オリゴヌクレオチドプライマーがそれらの標的配列にアニールし得る温度まで冷却し、その後、アニールしたプライマーをDNAポリメラーゼを用いて伸長

す

る。次いで、変性、アニーリング、および伸長のサイクルを多数回（代表的には25～35回）繰り返す。1回の増幅産物が次の標的核酸として作用することから、連続する各サイクルは本質的に標的DNAまたは増幅産物の量を2倍にする。

上記のように、本発明の1つの重要な局面は、第1および第2の蛍光指示薬として使用される蛍光色素である。指示薬の蛍光強度比を試験することにより、ほとんどの規則正しい変化性の供給源の効果（これは強度においてのみ現れる）を排除する。一般に、本発明によれば、第1の蛍光指示薬は、複合体形成色素、またはシグナルを生じるための重合の工程の間に分解されるオリゴヌクレオチドプローブに共有結合させた色素であり得る。この後者の実施態様は、いわゆる「Tacman」アプローチに関連し、Hollandら、Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 7276-7280(1991)により記載される。本明細書中で使用されるように、色素に関しての用語「複合体形成」は、色素が2本鎖または3本鎖核酸構造（通常はDNA）のいずれかを用いて安定な非共有結合性複合体を形成し得、そして色素の蛍光特性は、非複合体化（すなわちフリーの溶液）状態と比較して複合体状態において実質的に異なることを意味する。好ましくは、複合体形成色素の蛍光の量子効率が、フリーの溶液状態と比較して複合体状態において増強され、それにより、複合体形成の際増強された蛍光が得られる。典型的な複合体形成色素は、臭化エチジウム、ヨウ化プロビジウム、チアゾールオレンジ、アクリジンオレンジ、ダウノマイシン、メパクリン、4',6'ジアミジノ（diaminidino）-2-フェニルインドール（DAPI）、オキサゾールオレンジ、ビスベンズイミダゾール（bisbenzimidazole）色素（例えば、Hoechst 33258、およびHoechst 33342）、および種々の挿入色素のヘテロダイマー（例えば、エチジウム、アクリジン、チアゾリウム、およびオキサゾリウム色素（これらの頭字語POPRO, BOPRO, YOPRO, およびTOPROにより公知である））、ならびに以下の参考文献において記載される同様の色素を包含する：Haugland、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals、第5版、221-229頁（Molecular Probes, Inc., Eugene, 1992）；Glazerら、Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 3851-3855(1990)；Srinivasanら、Applied and Theoret

ical Electrophoresis, 3: 235-239(1993); Kapuscinskiら、Anal. Biochem., 83: 252-257(1977); Hill、Anal. Biochem., 70: 635638(1976); Setaroら、Anal.

Biochem., 71:313-317(1976); Lattら、J. Histochem. Cytochem., 24: 24-33(1976); および Ryeら、Nucleic Acids Research, 20: 2803-2812(1992)。好ましくは、複合体形成色素が第1の指示薬として使用される場合、このような色素は、チアゾールオレンジ、臭化エチジウム、およびTOPROからなる群より選択される。

第2の蛍光指示薬として使用される色素は、その蛍光特性が、核酸（特に、2本鎖DNA）の存在または結合により実質的に影響されない蛍光色素を包含する。このような色素は、特定の反応において使用される第1の蛍光指示薬からスペクトルでもまた分析可能なこの基準を満たす任意の蛍光色素を事実上包含する。好ましい第2の蛍光指示薬は、ローダミン色素およびフルオレセイン色素を包含する。より好ましくは、第2の蛍光指示薬は、テトラメチルローダミン、または2',4',5',7',テトラクロロ-4,7-ジクロロフルオレセインであり、後者はMenchenら、米国特許第5,188,934号で開示される。

好ましい実施態様においては、Leeら、Nucleic Acid Research, 21: 3761-3766(1993)に記載されるように、第1の蛍光指示薬および第2の蛍光指示薬は両方、オリゴヌクレオチドプローブに共有的に結合される。より詳細には、フルオレセインが第1の蛍光指示薬として用いられ、そしてテトラメチルローダミンが、第2の蛍光指示薬として用いられ、その結果、テトラメチルローダミン部分がフルオレセイン部分により実質的に任意の蛍光発光を消滅させる。従って、両方の色素を同じオリゴヌクレオチドに結合した場合、テトラメチルローダミンのみが蛍光シグナルを生じ得る。オリゴヌクレオチドが切断され（例えば、DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により）、2つの色素を分離する場合、フルオレセインは蛍光シグナルを生じ得るようになる。好ましくは、本実施態様において、励起ビームは、488nmのアルゴンイオンレーザーの発光線より生じる。本発明によれば、本実施態様のPCRにおける「フリーの」フルオレセインの産

物は、使用されるDNAポリメラーゼにより触媒されるDNA合成の量に比例し、そしてそれゆえ増幅産物の量に比例する。本実施態様において、好ましくは第1の蛍光指示薬はフルオレセイン（例えば、6-FAM(Applied Biosystems, Foster Cityより入手可能)）であり、そして第2の蛍光指示薬はテトラメチルローダミンまたは2',4',5',7',テトラクロロ-4,7-ジクロロフルオレセインのいずれかである。

本発明のこのようなオリゴヌクレオチドプローブは、多数のアプローチ（例えば、Ozakiら、Nucleic Acids Research, 20: 5205-5214(1992)；Agrawalら、Nucleic Acids Research, 18: 5419-5423(1990)；など）により合成され得る。好ましくは、オリゴヌクレオチドプローブは、ホスホルアミダイト化学を用いた自動固相DNA合成器（例えば、Applied Biosystems, Inc. モデル 392または394 DNA合成器(Foster City, CA)）で合成される。第1および第2の蛍光指示薬は、反応基を有するヌクレオシドホスホルアミダイトモノマーの使用により、オリゴヌクレオチドの既に決定されたヌクレオチドに共有結合され得る。例えば、このような反応基は、リン酸基またはリン酸アナログ上（例えば、Agrawalら(前述)）、ヌクレオチドの5'末端に対して結合する場合は5'水酸基上（例えば、Fungら、米国特許第4,757,141号、またはHobbs Jr., 米国特許第4,997,928号）、および塩基部分上（例えば、Ruth、米国特許第4,948,882号；Haralarnbidisら、Nucleic Acids Research, 15: 48<7-4876(1987)；Urdeaら、米国特許第5,093,232；Cruckshank、米国特許第5,091,519号；Hobbs Jr.ら、米国特許第5,151,507号；などにより開示される）にあり得る。最も好ましくは、ピリミジン部分を有するヌクレオチドが誘導体化される。さらに好ましくは、オリゴヌクレオチドプローブの3'末端ヌクレオチドをブロックするか、または核酸ポリメラーゼによる伸長を不可能にする。このようなブロッキングは、リン酸基の結合（例えば、HornおよびUrdea、Tetrahedron Lett., 27: 4705(1986)に記載される試薬を介して）により便利に行われ、そしてClontech Laboratories (Palo Alto, California) より5' Phosphate-ONIMとして市販されている。好ましくは、オリゴヌクレオチドプローブは、15~60ヌクレオチドの長さの範囲である。より好ましくは、オリゴヌク

レオチドプローブは、18～30ヌクレオチドの長さの範囲である。

オリゴヌクレオチドプローブ中の第1および第2の蛍光指示薬の分離は、第1の蛍光指示薬および第2の蛍光指示薬の性質、それらが結合された様式、照明源などにより変化し得る。所定の実施態様のための適切な距離の選択に関連する指標は、蛍光分子と消光分子（しばしば、それぞれ「ドナー」分子、および「アクセプター」分子とも呼ばれる）との間の共鳴エネルギー転移についての多くの参考文献において見出される（例えば、StryerおよびHaugland、Proc. Natl. Acad.

Sci., 58: 719-726(1967); Clegg、Meth. Enzymol., 211: 353-388(1992); Cardulloら、Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 8790-8794(1988); Ozakiら（前出）; Haugland（前出）; Hellerら、Fed. Proc., 46: 1968(1987)など）。第1の蛍光指示薬に由来する実質的に全て（例えば、90%）の蛍光が消滅するように、第1および第2の蛍光指示薬は、十分に接近しなければならない。代表的には、エネルギー転移に基づく消滅のために、第1の蛍光指示薬と第2の蛍光指示薬との間の距離は、10～100オングストロームの範囲であるべきである。好ましくは、第1の蛍光指示薬と第2の蛍光指示薬は、約4～10の間のヌクレオチドで分離され、そしてより好ましくは、これらは4～6の間のヌクレオチドにより、介在する二次構造（例えば、ヘアピンなど）を有さないという条件付きで分離される。好ましくは、第1の蛍光指示薬または第2の蛍光指示薬のいずれかが、オリゴヌクレオチドプローブの5'末端ヌクレオチドに結合される。

明らかに、上記の関連する実施態様が使用され得、ここで第1の蛍光指示薬は、第2の蛍光指示薬の代わりに別の非蛍光消光分子を伴うオリゴヌクレオチドプローブに結合される。このような実施態様において、第2の蛍光指示薬は、増幅産物と相互作用しない事実上の任意のスペクトルで分析可能な蛍光色素であり得る。

#### B. 反応チャンバー

本発明の重要な特徴は、反応チャンバーの蛍光検出装置の供給であり、これは、外部線源からの偽の蛍光を減少するように設計される。上記のように、本装置



における再現性がありかつ正確な結果は、低レベルのバックグラウンドの蛍光に依存する。これは、図2に記載される実施態様のように、複数のサンプルウェルを含む装置の配置において特に重要である。蛍光を発する汚染物（例えば、チューブホルダー内に存在する皮膚の薄片、または髪）は、各反応チャンバー内で測定されるバックグラウンドに異なる増加量を付加し得る。さらに、以下で示すように、このようなバックグラウンドは、測定された蛍光スペクトルを通じて一定ではないが、むしろ汚染源により変化する特徴的なピークの蛍光発光を有する。このような他と異なるバックグラウンドは、各チューブについて「ブランク」スペクトルを測定することにより引き算され得るが、これはシグナル対ノイズ比を著

しく減少させる。

上記および共通所有の特許出願公報第W0 9530139において記載されるように、バックグラウンドの蛍光を減少させる必要性は、分析熱サイクラー（ATC）装置において特に重要である。複数のチューブを循環し、そして同時にモニターするために、この装置が、「プレートリーダー」形式におけるPCR中のDNA増幅物の光学的な同時検出と、熱サイクリングとを組み合わせる。例えば、こぼれたサンプルまたは剥がれた皮膚によるチューブホルダーの汚染が個々のシグナル強度を付加し得ることが見出されている。

本発明を裏付けるために実施される実験において、チューブホルダー壁により支えられる領域内でテクスチャーされたチューブ内で反応を行うことにより、チューブホルダー内の汚染の結果であるバックグラウンドが、著しく減少され得ることが見出されている。本発明の文脈において「テクスチャーする」は、チューブに濁った、または半透明の光学透過特性を与え、そして表面粗さおよびピーク密度特性として規定され得る表面特性を意味する。

より詳細には、チューブの表面粗さおよびピーク密度特性は例えば、チューブホルダーの壁部上の汚染に関連する偽のバックグラウンドの蛍光発光に応答した、上記装置内の検出器により検出されるバックグラウンドの蛍光を著しく減少することである。以下で見られるように、テクスチャーを形成する「谷」の平均の

深度により測定される表面粗さは、好ましくは、0.0002～0.003インチ（0.2～3ミル）であり、そしてより好ましくは、0.001インチ（1ミル）未満である。好ましいピーク密度は、0.5インチ直線（inch line）あたり50～500ピークであり、より好ましくは、0.5インチ直線あたり200～500ピークである。表面粗さ特性は、従来の方法により測定され得る。例えば、ピーク密度（0.5直線インチあたりのピークとして表される）、および平均の谷の深度（インチで測定される）が、プロフィールメーター装置（例えば、Hommel T-1000プロフィールメーター（Tubingen, Germany））を用いて測定され得、ここで、針は表面上を動く。本発明の文脈において、このようなプロフィールメーター測定を行うことは、困難であり得る。なぜなら、好ましいチューブは、曲がった、かつ小さなチューブであるからである。しかし、本発明で使用されるチューブのテクスチャーの評価は、類似の型から平

坦なテクスチャーされた表面を形成すること、またはチューブのテクスチャーを形成するために使用される工程と類似の工程により表面の平坦なテクスチャーを形成し、次いで、得られたピークおよび谷の輪郭を上記のように測定することにより、成され得ることは認識される。この測定は、チューブの粗さまたはテクスチャリングのパラメーターの評価を提供する。

このようなバックグラウンド発光がまた、完全に不透明なチューブ（すなわち、光を透過し得ない）を使用することにより排除され得、バックグラウンド発光の実質的な減少の目的を提供することが認識される；しかし、反応混合物のためのこのチューブの使用の特定の目的のために、半透明な特性は、チューブ内のサンプルまたは反応混合物の存在を視覚的または電子的にモニターし得るという利点を提供する。本発明に従って作製される半透明な、またはテクスチャーされたチューブは、比較できる透明なチューブまたはサンプルウェル自身より測定されるバックグラウンド蛍光と比較して、バックグラウンド蛍光を著しく減少させる。

一般に、本発明に従って作製されるチューブは、プラスチック（例えば、ポリプロピレンまたはポリカーボネート）から成形される。これらのプラスチックは

、PCR分析においても一般に使用される。なぜなら、これらは不活性であり、そして生物学的サンプルの非特異的結合を促進しないからである。しかし、上記の一般的な光学および化学的特性を有する任意の材料が、このようなチューブの作製における使用に適切であることが認識される。

全チューブが、種々のサンプルホルダー配置に適合するようにテクスチャーされ得る；しかし、チューブのテクスチャーされる部分は、少なくともチューブのサンプル部分と接触する部分である。最小限には、テクスチャーされる部分は、チューブを用いる蛍光モニタリング装置において存在する検出手段の外形に従って、外部蛍光が検出され得る任意の領域を包含する。

チューブのテクスチャーされた領域は、多くの手段のうちの1つ以上において形成され得る。異なる方法により形成されるテクスチャー領域を有するチューブを用いた本発明を裏付けるために実行される実験の結果、以下の表1および表2を提供する。各チューブを、上記のように複数の反応チャンバーを有する分析熱サイクラー（ATC）の空のウェルに置く。表1に示されるデータは、蛍光を発す

る汚染により中程度に汚染されたことが既知のウェル（ウェル51）に置かれたチューブによる。ウェルから得られる蛍光スペクトルは、汚染のための蛍光最大値が、ATCのCCDサンプリングデバイスのピン21領域にあることを示した。この領域は、波長約544nmの光を示す。この領域において、空のウェルは1300A/D単位の光（1A/D単位は、蛍光強度の相対単位である；このような測定において、適切なブランク（閉じたシャッターの暗さ）と100%透過値との間で連続を形成する限り、任意の単位が使用され得る）の蛍光を発した。テストサンプルチューブはウェル内に独立に配置され、そして光の発光を記録された。得られる値を閉じたシャッター状態に比較した平均シグナル強度（Average Signal Intensity）（ここで、刺激されない光は、チューブを透過する）、および透過光パーセント（ここで、100%は、チューブの非存在下でウェルにより発光された光の量により規定される）として表1に示す。

表2は、高度に汚染（チューブの非存在下において2769 A/D単位の光）されたことが既知のウェル（ウェル50）による透過値を示す。表1および表2は、標準

的なポリプロピレンチューブが、わずかに汚染源からの光透過を増強する（表1）か、または存在する汚染量に依存してわずかに光透過を減少させる（表2）かのいずれかであることを示す。

表1および表2のデータが示すように、種々のテクスチャリング手段は、ウェルの汚染源から発せられる光の発光を著しくブロックするテクスチャリング特性を生じるために効果的である。比較の目的のために、領域を形成するポリマーの重合の間のポリプロピレン中の二酸化チタンの含有により半透明化されたチューブもまた試験した。このようなチューブは、汚染源の光透過（表2）の減少において透明なチューブより効果的であったが、テクスチャーされたチューブよりは効果的ではなかった。

表 1

チューブ/状態	平均シグナル強度 (A/D 単位 @ ピン 12) (シャッター閉=0 となるように調整した値)	透過光パーセント
シャッター閉	0	0%
化学的にエッチングされたポリスチレン	901	69%
EDMでエッチングされたポリスチレン	1038	80%
ポリプロピレンで粗くした	1143	88%
二酸化チタン充填	1322	102%
透明なチューブ	1482	114%
空のウェル	1300	100%

表 2

チューブ/状態	平均シグナル強度 (A/D 単位 @ ピン 12) (シャッター閉=0 となるように調整した値)	透過光パーセント
シャッター閉	0	0%
化学的にエッチングされたポリスチレン	1393	50%
EDMでエッチングされたポリスチレン	1584	57%
ポリプロピレンで粗くした	1603	58%
二酸化チタン充填	1855	67%
透明なチューブ	2272	82%
空のウェル	2769	100%

本発明の基礎をなす機構的な理論に付することなしに、このようなテクスチャリングはチューブの表面に衝突する光を分散し、そしてチューブホルダー内の外部源からチューブ内部に指向する光を妨害するかまたは光の量を減少させることに留意する。

バックグラウンドの蛍光を望ましく減少させるのに効果的なチューブの表面のテクスチャーを形成する多くの方法が存在する。1つの一般的な実施態様は、型どられたチューブはテクスチャーされた型でキャストされ、次いで、チューブに

テクスチャーされた不規則な表面を与える。テクスチャーされた型を形成する手段は当該分野で周知であるが、一般的には、以下で記載するような化学的または物理的な手段による、型のエッチングを包含する。

典型的なエッチング手段は、型穴のビーズ噴射、型穴の放電加工、および型穴の化学的なエッチングを包含する。これらの手段の全ては好ましくは、チューブの外部表面にテクスチャリングを作製するためのこのような方法において型表面上で行われることに留意すべきである。チューブの内部表面のテクスチャリングまた、外部蛍光源からの光の透過を減少させるが、このような内部テクスチャリングは本発明の文脈においてはより所望されない。なぜなら、内部テクスチャリングは、反応、またはチューブから反応混合物を定量的に除去する能力を妨害し得るからである。

テクスチャーされたチューブを形成するために適切なエッチングされた金属の型は、多くの方法により作製される。このような型を作製する1つの伝統的な手段は、型の穴を「ビーズ噴射」することである。この工程は、高速粒子（例えば、重炭酸ナトリウム(重層)の粒子)を表面にぶつけることにより、型表面から金属の小さなくぼみを除去する。

エッチングされた型の表面はまた、電気のアークを用いて衝撃を与えることにより型から金属の小さなくぼみを除去する放電加工(EDM)手法により形成され得る。表1および表2で示すように、このような手法を用いて、ウェルの汚染による光の発光を、中程度に汚染したウェルにおいては20%程度、高度に汚染したウェルにおいては43%程度減少させた。

型はまた、化学的なエッチング手段によりエッチングされ得る。一般的には、成形の分野で周知の方法に従って、テクスチャーの領域内の型表面上にマスクが置かれる。次いで型は酸溶液中に浸され、マスクされていない領域から金属が除去される。この工程は、型表面の高度に密集した不規則な表面パターンを作製するために使用され得る。これは特に効果的であり、そして本発明に従って外部のチューブのテクスチャーを作製する手段を制御する。

Mold Tech (Roehlen Industries, Walnut, CA) 手順は、特定の平均の厚さ、ならびに規定されたピークおよび谷を有するテクスチャーを、化学的なエッチングにより作製する。このようなテクスチャーは、当該分野で周知であり、そして工業的な基準と考えられているそれらのMold Tech Pattern仕様番号により最も特徴づけられる。表3は、本発明に従ってチューブ上のテクスチャーの形成に使用されてきた多くの典型的なMold Tech patternを列挙する。MT-11000は(MT-11003~MT-11005)シリーズのテクスチャリングのパターンは、規定された大きさの粗粉(例えば、酸化アルミニウム)を用いて金属型に噴射することにより作製される。MT-1055シリーズは、酸のエッチングにより作製される。

表3

Mold Tech Pattern 仕様	エッチングの平均深度
MT-11003	.000195 インチ
MT-11004	.000267 インチ
MT-11005	.000477 インチ
MT-11006	.001002 インチ
MT-11007	.001468 インチ
MT-1055-2	.00063 インチ
MT-1055-3	.00072 インチ
MT-1055-4	.00093 インチ
MT-1055-5	.00097 インチ
MT-1055	.00145 インチ

表1および表2に示すデータから見られるように、化学的なエッチング型(MT-1055-5)によるチューブは、中程度に汚染したウェルからの汚染発光(31%減

少) および高度に汚染したウェルからの汚染発光(50%減少)を著しく減少した。上記のように、例示される実施態様において使用するために調製される小さいチューブの状況において、これらのパターンのテクスチャリング特性を正確に測定することは困難であるが、これらのパラメーターの良好な評価は、同じ型処理方法を用いた類似の平坦な表面を調製し、そしてこのような表面の平均ピーク密度および平均の谷の深度を測定することにより行われ得る。MT-1055-5のテクスチャ

チャーは、0.5インチ直線あたり88ピークのピーク密度、および0.00097インチの平均の厚さ(エッチングの深度)を有する。他の特に効果的なチューブは、0.5インチ直線あたり379ピークのピーク密度、および0.000477インチの平均の厚さを有するMT-11005、ならびに0.5インチ直線あたり283ピークのピーク密度、および0.001002インチの平均の厚さを有するMT-11006から形成されている。より一般的には、0.5インチ直線あたり約50ピークと500ピークとの間のピーク密度、および約0.0002インチと0.003インチとの間の平均の厚さを有するテクスチャーが本発明の使用のために好ましいことが認識される。より詳細には、PCR反応において使用するための好ましい成形のパターンは、深度および熱転移の両方を最大にするために、範囲の上端のピーク密度(0.5インチ直線あたり200~500ピーク)、および0.004インチと0.001インチとの間の厚さを有する。

別の一般的な実施態様において、テクスチャリングは、表面をすり減らすかまたは粗くする(例えば、研磨テープまたは研磨布を用いて、または研磨用の粒子の存在下での回転ブラシ研磨によって)ことにより作製される。本発明を裏付けるために実施された実験において、ポリプロピレンチューブの外部表面に対するサンドペーパー(240、320、または400グリット)の適用は、中程度および高度に汚染したウェル中の汚染に関連する発光を、少なくともそれぞれ12%および42%ブロックし得るチューブを生じることが測定された(表1および表2)。

図3Aおよび3Bは、本発明に従って作製されたチューブ60の平面図および断面図をそれぞれ示す。この示されるチューブは、約200マイクロリットルの総容量を有し、そして許容し得る再粉碎(regrind)を有さない、汚れていないポリ

プロピレンから形成される。このチューブはまた、匹敵するグレードのポリカーボネートからも形成され得る。

図3Aに示すように、チューブ60は、リッジ66により分けられる上部領域62および下部領域64を有する。リッジ66は、上記のように、チューブホルダー内にチューブを置くために構築され、そして配置される。上部領域62は、リップ65にチューブの上端で結合される。リップ65は、チューブの上部の開口部を制限し、そして売主のマークを押印され得る。リップ65は、図1に示すように透明のキャップを受けるように構築され得るか、またはここで示すように、サンプルの励起ビームを透過させ得るために開口部は開いたままであり得る。

図3Bに関して、チューブ60の外部表面上の可視のリッジおよび他の表面の起伏の特徴は、内部表面68には反映されない。内部表面68は、チューブからの量的なサンプルの移動を容易にするために好ましくは滑らかなままである。示される実施態様において、チューブの壁の厚さはチューブの種々の領域の間で多様であることが見出され得る。図示される200 $\mu$ mのチューブ60において、壁の厚さは、70で示された下部領域における0.009インチから、72で示されたチューブの上部における0.015インチまで変化する。チューブの底74は、より高い圧力（例えば、遠心中に遭遇するような圧力）に耐えるためにより厚い（0.029インチ）。

図3Aに戻ると、下部領域64は、上記のように、0.00097インチの平均のエッチングの深度を有するMold Tech pattern MT1055-5に従って適用されたテクスチャーされた表面76として示される。図3Aで示されるチューブの記述に従って構築され、そしてテクスチャーされたかまたは半透明の下部領域を有するポリプロピレンチューブが、上記のようにATCの高度に汚染されたウェルに配置されて試験された。CCD検出システム（ここでピン1～32は約500～600nmの発光波長に対応する）を用いて、488nmにおける励起後に各チューブについて完全な発光スペクトルを記録した。図4および図5は、以下のように、ATCの中程度に汚染したウェル（ウェル51）および高度に汚染したウェル（ウェル50）からの記録されたスペクトルの比較を示す：空のウェル（菱形）、EDMでテクスチャーされ、そして不可視光線下で高い初期の蛍光を示すチューブ（黒三角）、透明なMicroAmp™



チューブ（黒丸）、二酸化チタンを含有する半透明なチューブ（クロス）、サンドペーパー処理により粗くしたチューブ（白丸）、EDMでテクスチャーし、そして不可視光線下で低い初期の蛍光を示すチューブ（クロス）、および下部表面上にMold Tech pattern MT1055-5上の化学的エッチングを有するチューブ（黒四角）。閉じたシャッターの読みとりを、両方の図において点画の四角で示す。

以下に実施例を示すが、本発明を制限することは決して意図されない。

#### 実施例 1

##### 種々の開始濃度の標的DNAからのQ-アクチンをコードするDNAの

##### PCR増幅の同時モニタリング

ヒトB-アクチンをコードする標的DNAの296塩基対セグメントを、 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ コピーの範囲の種々の開始量の標的DNAからPCRにより増幅した。以下のプライマーおよびプローブを使用した：

5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA

（正方向プライマー）

5'-CAGCGGAACCGCTCATTTGCCAATGGT

（逆方向プライマー）

5'-A(FAM)TGCCCT(TMR)CCCCCATGCCATCCTGCGT

（プローブ）

ここで、「FAM」は、フルオレセインの6炭素に結合したNHS-エステル基と、Fungらの米国特許第5,212,304号に従ってオリゴヌクレオチドの5'末端のデオキシアデノシンに結合した5'アミノリン酸基とを反応することにより、オリゴヌクレオチドに結合した蛍光分子を示す；およびここで、「TMRH」は、Urdeaらの米国特許第5,093,232号に開示されるアミノ連結剤を介して、隣接したチミジンの塩基部分に結合したテトラメチルローダミン分子を示す。

PCRは、以下の成分を用いて0.2mL MicroAmpチューブ（Perkin-Elmer, Norwalk, CT）中で行われた：10mM Tris-HCl, pH 8.3、50mM KCl、3.5mM MgCl<sub>2</sub>、ヌクレオシド三リン酸各200  $\mu$ M（キャリアオーバーの汚染を防ぐために、米国特許第5,035,996号に従ってdUTPをdTTPの代用として用いた）、正方向プライマーおよび

逆方向プライマー各300nM、0.05U/ $\mu$ LのAmpliTaq (Perkin-Elmer, Norwalk, CT)。この混合物に、10ng/ $\mu$ Lでの5 $\mu$ LのRaji DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA)、2 $\mu$ Mでの5 $\mu$ Lのプロープ、および1ユニット/ $\mu$ Lでの1 $\mu$ LのウラシルN-グリコシラーゼを添加し、反応容量を51 $\mu$ Lにした。加熱および冷却のサイクルを、本発明のサンプルインターフェース成分を含むサンプルホルダーカバーを取り付けたモデル9600 Thermal Cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) 中に行った。以下の温度プロファイルを使用した：2分間50℃に保つ；10分間95℃に保つ；以下の温度で40回循環する：92℃で15秒間、54℃で15秒間、72℃で1分間；次いで72℃に保つ。

図6は、蛍光の発光スペクトル、および上記の指示薬として使用されるテトラメチルローダミン色素、および装置の外来の供給源による蛍光を示すデータを図示する。

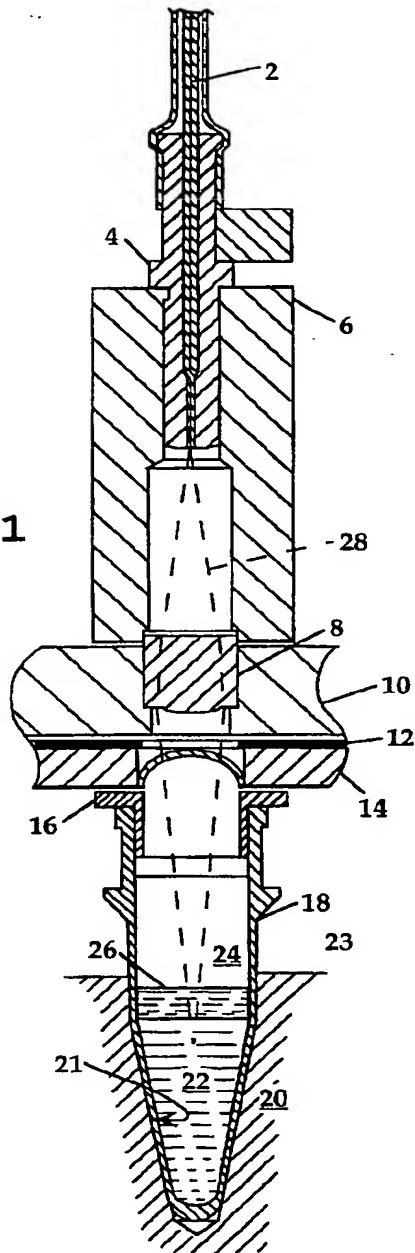
図7は、サイクル数の関数として、フルオレセイン蛍光強度およびテトラメチルローダミン蛍光強度を示すデータを図示する。強度における高頻度の振動は、2つの色素の蛍光発光の温度依存性を反映する。サイクル10とサイクル28との間の両方の色素のベースラインの蛍光における増大は、システムに基づく変動である。図8は、同じデータに由来するフルオレセイン対テトラメチルローダミンの蛍光強度の比を示し、システムに基づく変動は排除され、そして読み出しシグナルにおける揺らぎのRMS、すなわち蛍光強度比は測定される比の平均の大きさの1%未満である。

図9は、図中で示されるように、5000標的分子から $10^6$ 標的分子の範囲の量から開始されるMartin DNAのPCRによるデータを示す。

本発明は、特定の方法および実施態様を参照して記載されているが、様々な修飾および改変が本発明から逸脱することなくなされ得ることが認識される。

【 図 1 】

Fig. 1



【 図 2 】

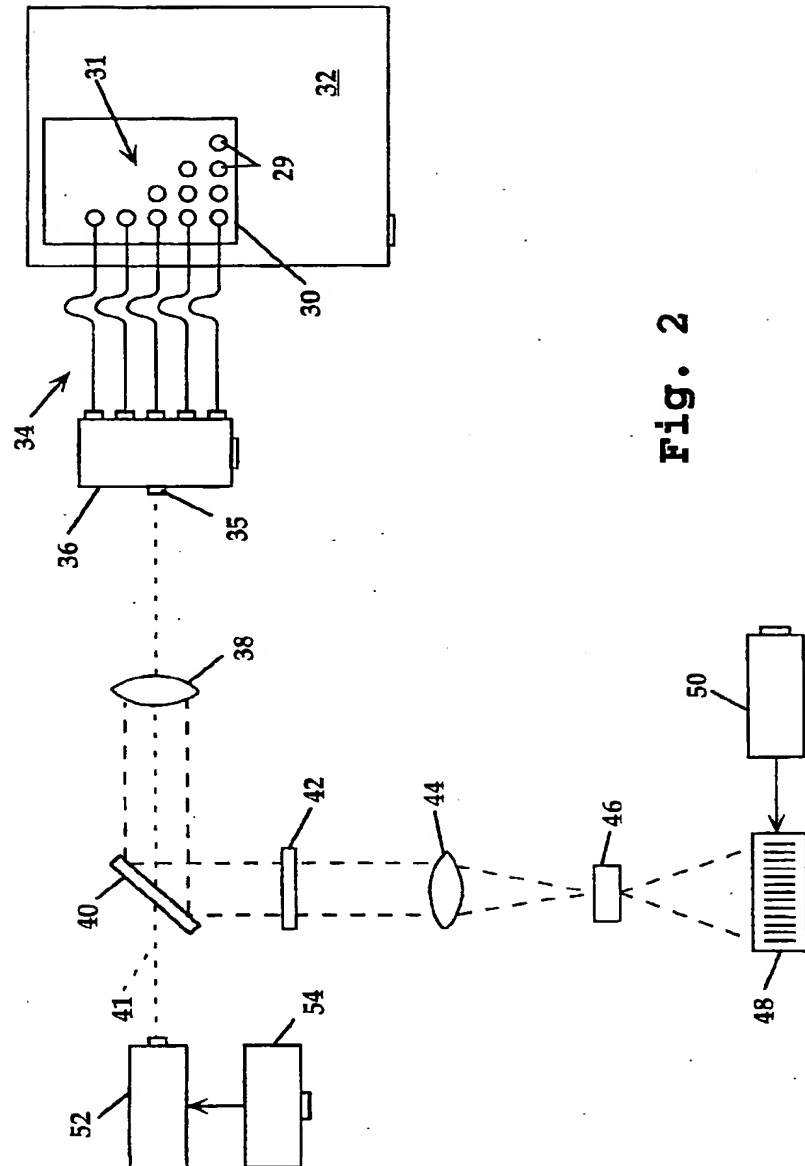


Fig. 2

【図 3 A】

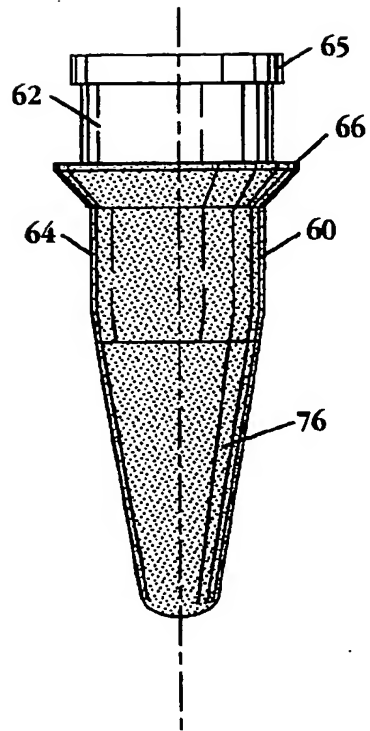
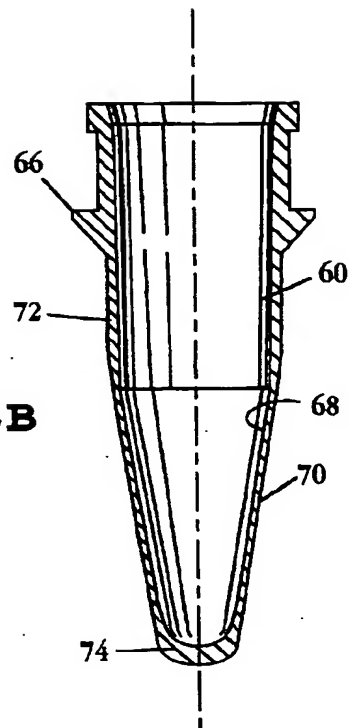


Fig. 3A

【図3】

Fig. 3B



【図4】

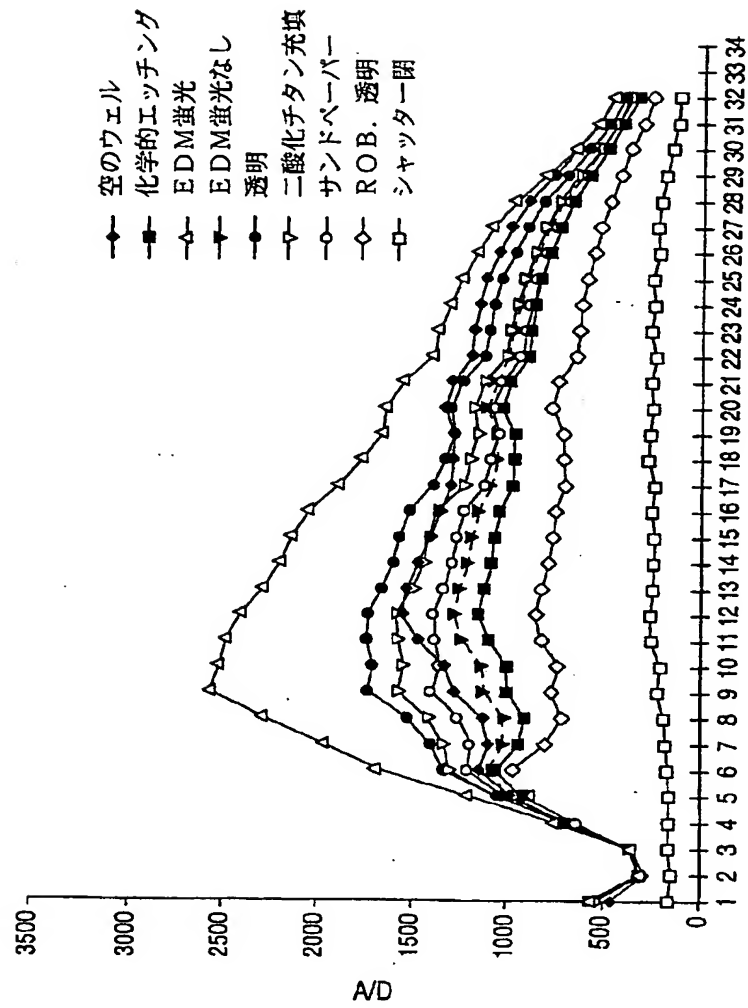


Fig. 4

【図5】

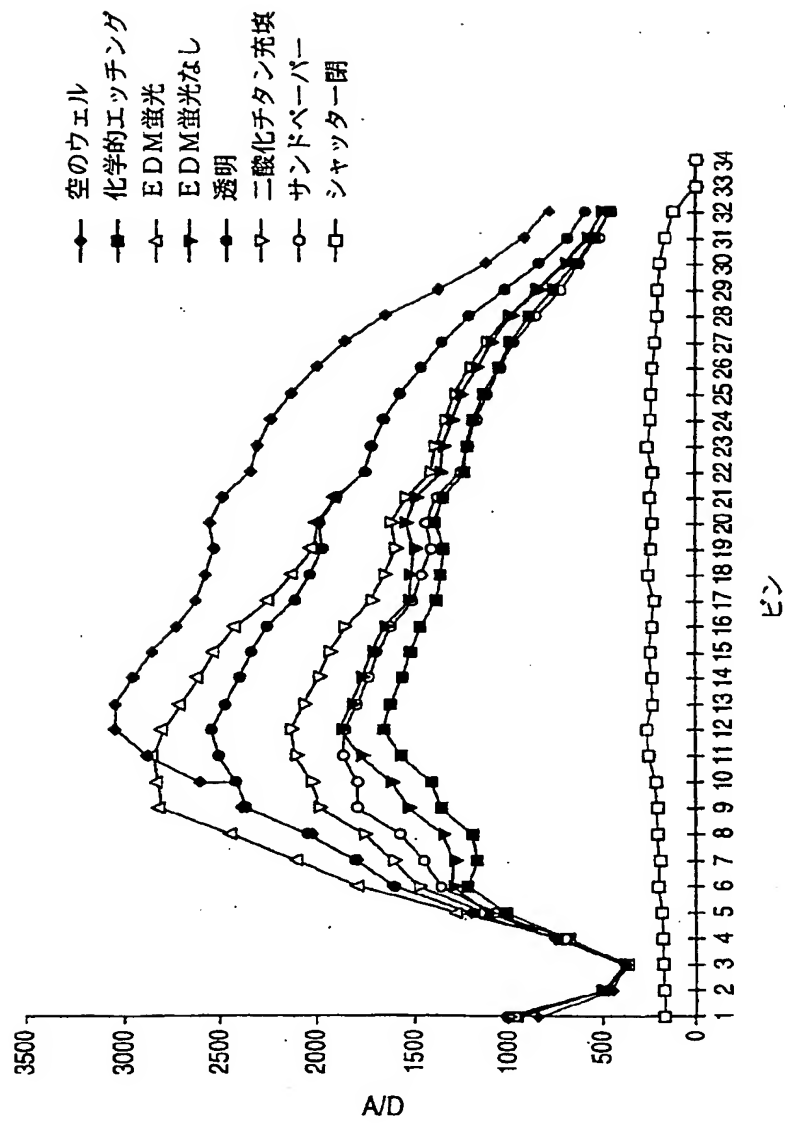


Fig. 5



【図 6】

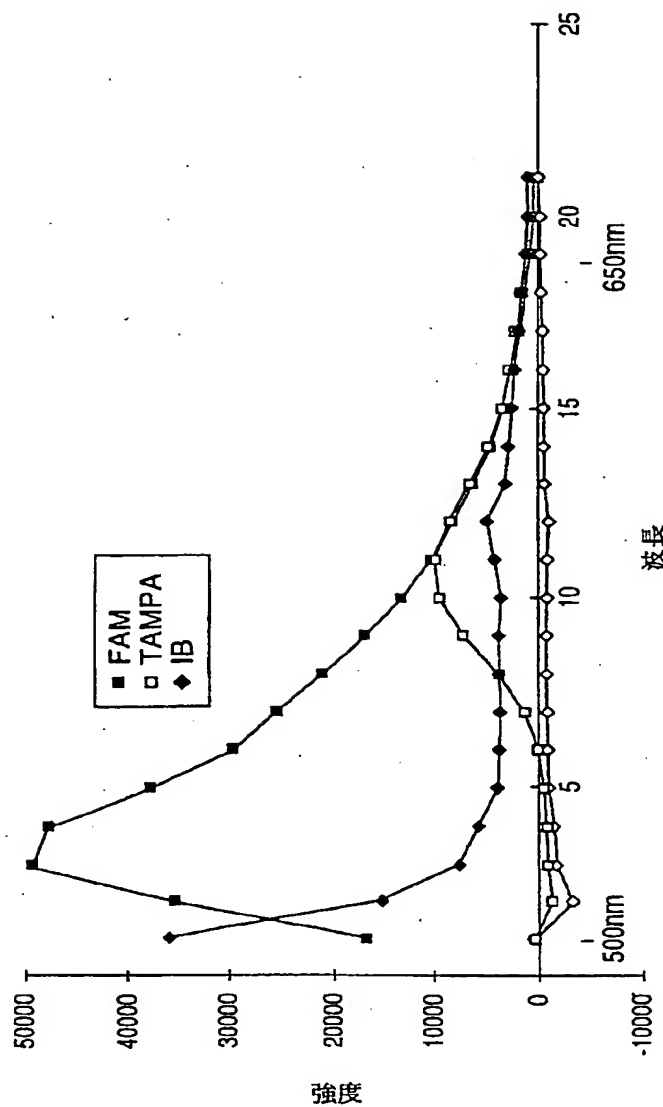


Fig. 6

【図7】

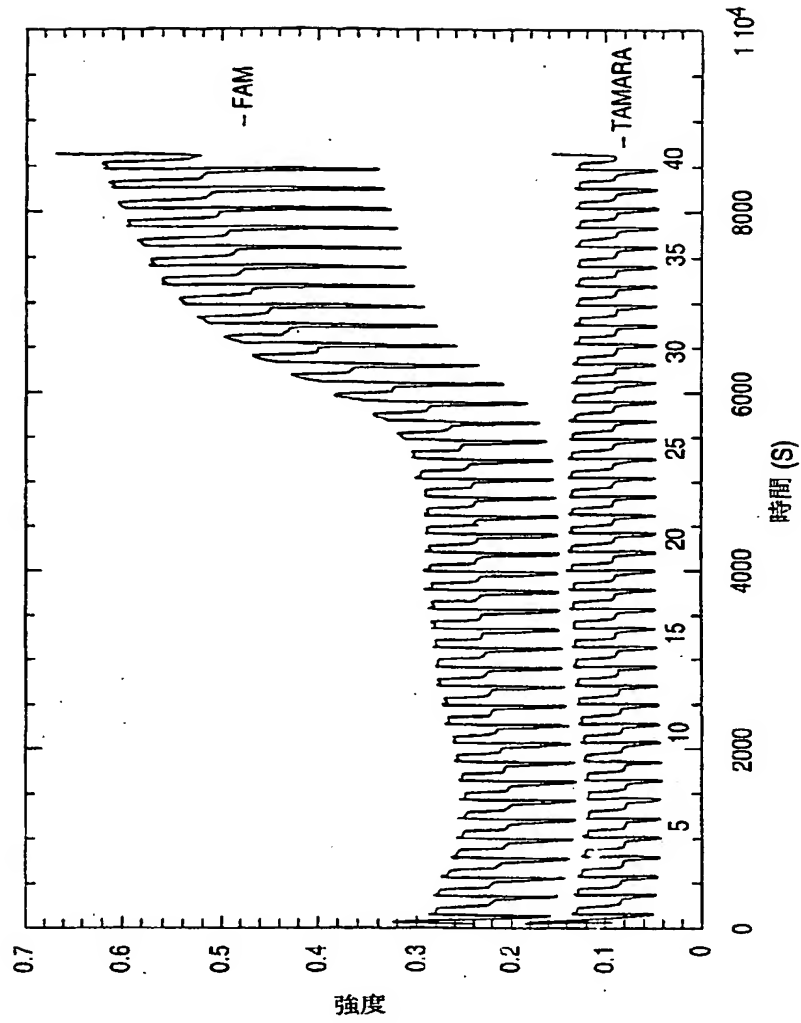


Fig. 7

【図 8】

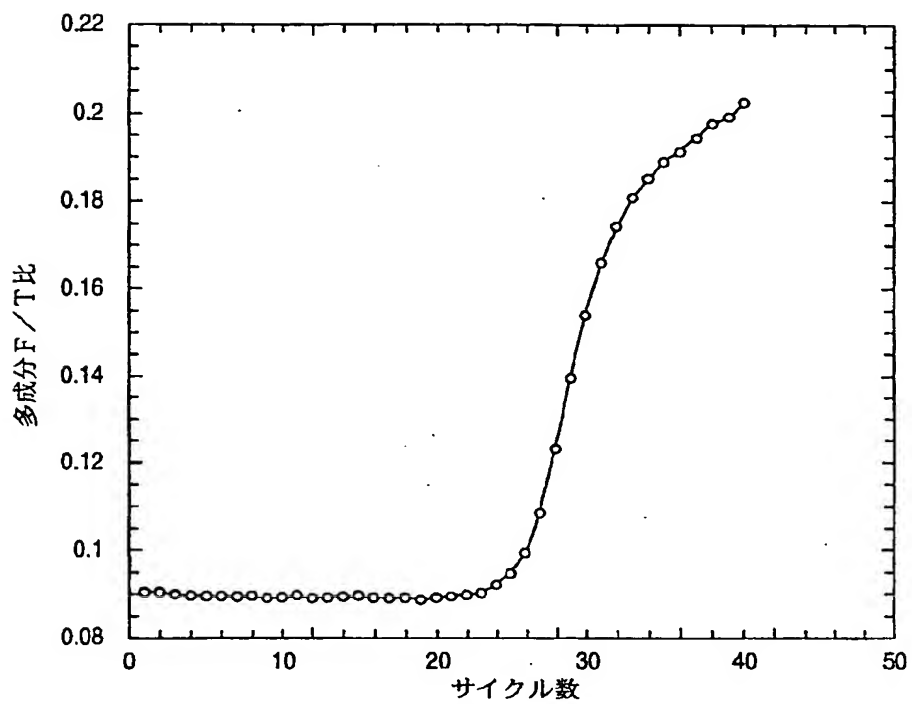


Fig. 8

【図9】

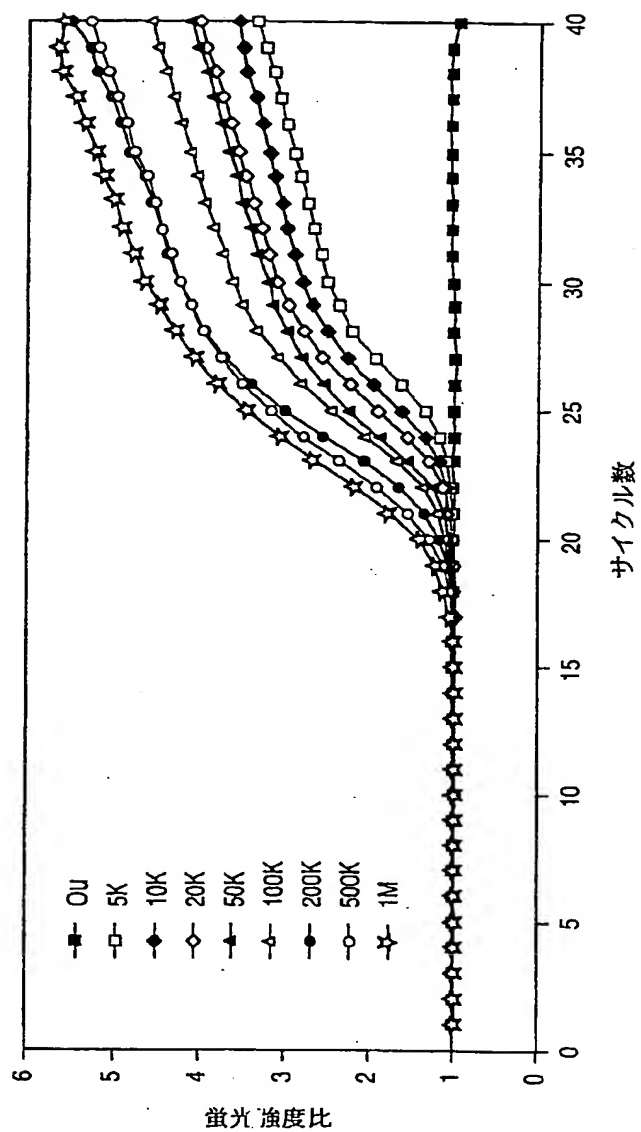


Fig. 9

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.  
PCT/US 96/19238

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 G01N21/03 G01N21/64		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbol) IPC 6 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim No.
Y	WO 95 30139 A (PERKIN-ELMER) 9 November 1995 cited in the application see abstract see page 3, line 30 - line 37 see page 7, line 24 - line 28 see page 8, line 1 - line 10 see claims 6,13; figures 1,2 ---	1-3,8,9
Y	WO 90 01168 A (PRECISION SYSTEMS) 8 February 1990 see page 12, line 6 - line 15 see figures 5,6 ---	1-3,8,9
A	EP 0 147 124 A (LABSYSTEMS) 3 July 1985 see abstract see page 3, line 12 - line 24 see figures ---	1,2,8
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 March 1997		Date of mailing of the international search report 04.04.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 1200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 000 nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Thomas, R.M.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Enter International Application No. PCT/US 96/19238
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 037 974 A (FLETCHER) 26 July 1977 see abstract see column 3, line 44 - line 51 see figure 5 -----	1,8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 96/19238

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9530139 A	09-11-95	AU 2389695 A	29-11-95
		CA 2159830 A	30-10-95
		EP 0706649 A	17-04-96
		JP 8510562 T	05-11-96
WO 9001168 A	08-02-90	DE 68915767 D	07-07-94
		EP 0426729 A	15-05-91
		JP 3506075 T	26-12-91
		US 5597733 A	28-01-97
		US 5229074 A	20-07-93
EP 0147124 A	03-07-85	DE 3474593 A	17-11-88
		JP 60177245 A	11-09-85
		US 4684250 A	04-08-87
US 4037974 A	26-07-77	NONE	

---

フロントページの続き

(72)発明者 マーマロ, ジェフリー エム.  
アメリカ合衆国 コロラド 80014, オー  
ロラ, イー. ウェスリー アベニュー  
15154